

ORSAY
Série A, n° 66
N° d'ordre:

THESES
présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE
L' UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de DOCTEUR-INGENIEUR

par

Daria Arlette BOGDANOVSKY

1ère THESE : "Synthèses de l'aspergillomarasmine B
racémique et de quelques analogues".

2ème THESE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

17 MAI 1968

devant la Commission d'Examen

MM. E. LEDERER	Président
M. FETIZON	Rapporteur
P. SCHAEFFER	

ORSAY
1968

ORSAY
Série A, n°
N° d'ordre:

THESES
présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE
L' UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de DOCTEUR-INGENIEUR

par

Daria Arlette BOGDANOVSKY

1ère THESE : "Synthèses de l'aspergillomarasmine B
racémique et de quelques analogues".

2ème THESE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

devant la Commission d'Examen

MM. E. LEDERER	Président
M. FETIZON	Rapporteur
P. SCHAEFFER	

ORSAY
1968

Cette thèse a été effectuée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette , dirigé par Monsieur le Professeur E. LEDERER.

Je suis heureuse de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir orientée vers la Recherche scientifique, pour les conseils et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués et pour son appui constant.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur M. BARBIER, Maître de Recherche au C.N.R.S. Il m'est particulièrement agréable de pouvoir le remercier ici pour l'aide et l'amitié dont il a toujours fait preuve à mon égard.

Je prie Monsieur E. BRICAS, Maître de Recherche au C.N.R.S. de trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance pour sa sollicitude depuis mon entrée dans son laboratoire. Le deuxième sujet de cette thèse a été préparé dans son équipe de recherche.

Je voudrais tout particulièrement remercier Monsieur le Professeur P. SCHAEFFER pour ses nombreux encouragements, et pour avoir accepté de faire partie de mon Jury.

Je remercie Monsieur le Professeur M. FETIZON, d'avoir lui aussi, accepté de faire partie de mon Jury.

C'est un plaisir pour moi de remercier Messieurs W. VETTER et A. GAUDEMER pour une interprétation pertinente des spectres de masse et de résonance magnétique nucléaire.

Je remercie également Melle J. JALICOT qui a effectué avec beaucoup d'amabilité la dactylographie de cette thèse.

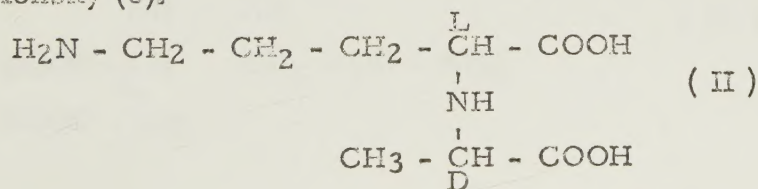
Enfin, je tiens à remercier tous mes camarades de laboratoire dont l'attitude très amicale a toujours facilité mes conditions de travail.

Information on the availability of the data is available at <http://www.inec.org>.

1-Acides iminés formés de l'union de deux chaînes carbonées, par un groupe $> \text{NH}$.

$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{\text{L}}{\underset{\text{NH}}{\text{CH}}} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \text{NH} \end{array} \quad \text{(I)}$$

En 1956, Lioret (5) isolait la lysopine (II) à partir des tissus de "crown-gall" de diverses plantes. La structure chimique fut déterminée et la synthèse réalisée en 1960 par Biemann, Lioret, Asselineau, Lederer et Polonsky (6).



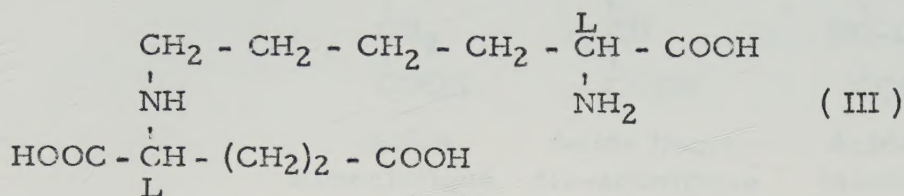


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549932_0048

Les deux chaînes carbonées constituant la lysopine sont celles de la lysine et de l' α -alanine.

La saccharopine (III) isolée de la levure par Darling et Larsen (7) en 1960, fut synthétisée la même année par Kjaer et Larsen (8). Pour la saccharopine, les deux chaînes carbonées sont celles de la lysine et de l'acide glutamique.



Cet acide iminé (III) a été également isolé de N. crassa (9); c'est un précurseur dans la biosynthèse de la lysine (Tableau I). De nombreux travaux (9, 10, 11, 12, 13, 14) montrent que cette biosynthèse de la lysine, utilise comme précurseur l'acide α -amino adipique chez les ascomycètes, alors que chez les bactéries l'intermédiaire est l'acide α, α' -diaminopimélique.

Jusqu'à présent, on sait peu de choses sur les propriétés biologiques de ces substances. Leur rôle dans le mécanisme cellulaire reste à préciser.

2 - Acides iminés formés de l'union de trois chaînes carbonées par deux groupements $> \text{NH}$.

Quatre nouvelles substances appartenant à cette catégorie ont été identifiées depuis 1962.

a) La lycomarasmine:

La lycomarasmine (IV) a été isolée de Fusarium lycopersici par Clauson-Kaas, Plattner et Gäumann (15) et récemment de Fusarium oxysporum f. vasinfectum (16) et de Fusarium oxysporum f. melonis (17), et sa structure établie par Hardegger et coll. (18).

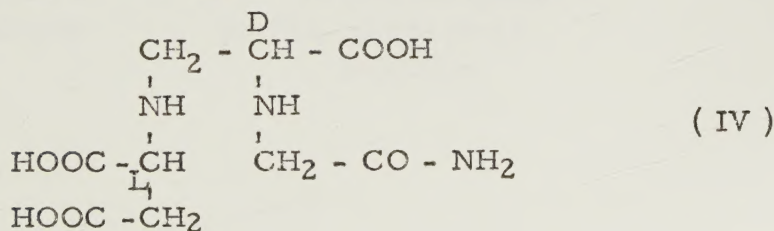
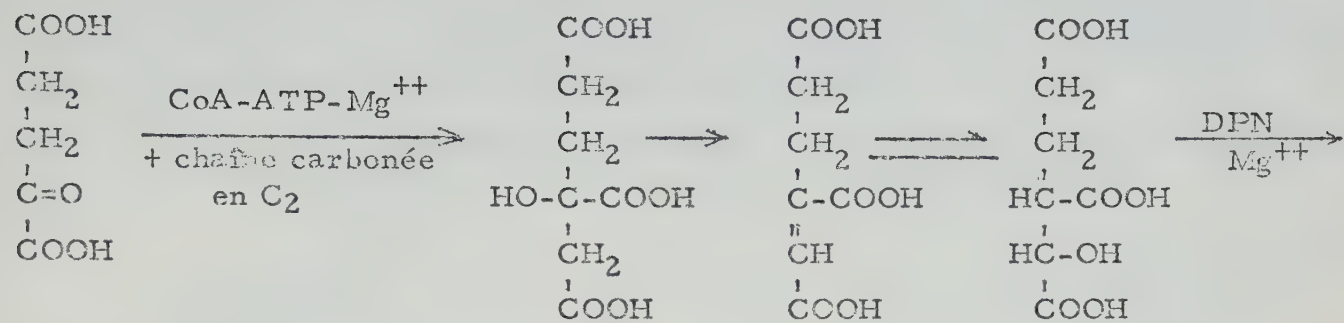


TABLEAU I

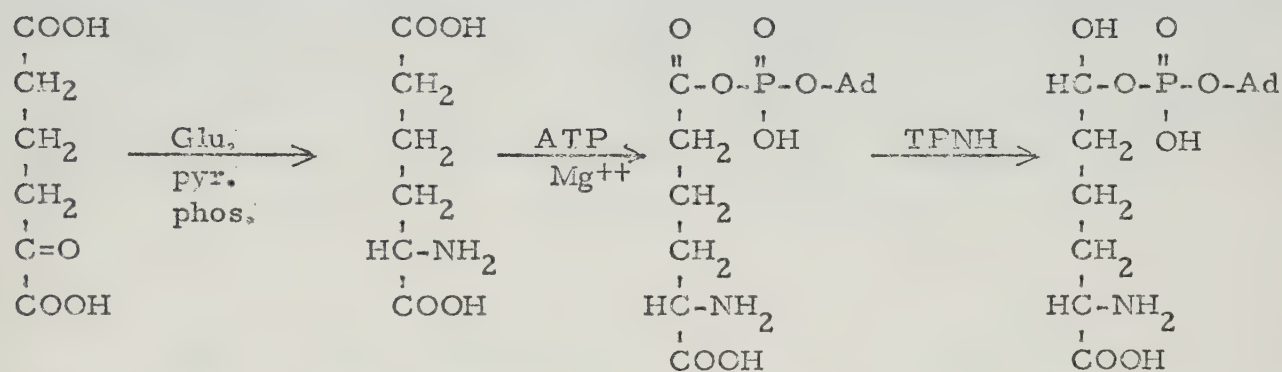


Acide α -céto-glutarique

Acide monocitrique

Acide homocis-aconitique

Acide homoisocitrique

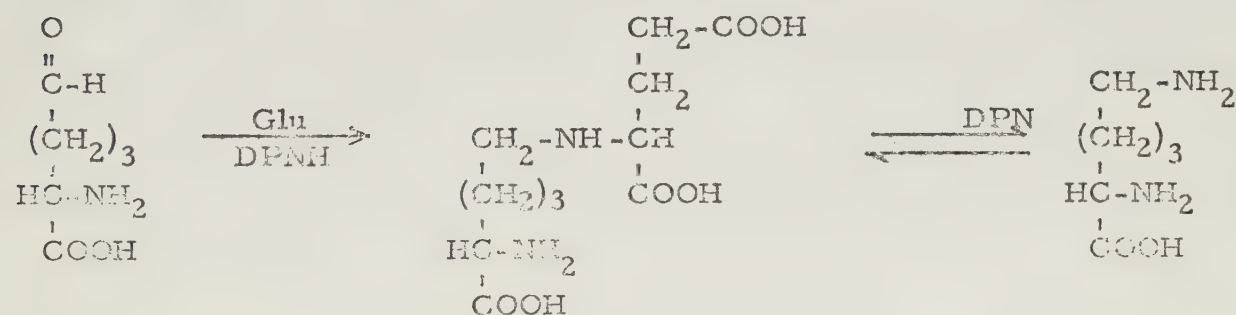


Acide α -céto-adipique

Acide α -amino-adipique

Acide α -amino- δ -adényl-adipique

Acide α -amino- δ -adényl-semi-adipaldéhyde



Acide α -amino- δ -semi-adipaldéhyde

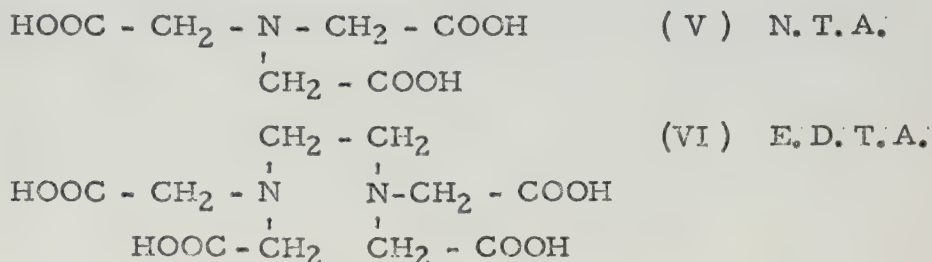
L-saccharopine
(ϵ -N(L-glutaryl-2)
L-lysine

L-lysine

Cette substance, toxine sécrétée par des champignons phytopathogènes, provoque la perturbation du métabolisme de l'eau dans les feuilles de certaines plantes (tomates, pommes de terre, géranium...): Elle correspond à la définition des marasmines telle qu'elle a été proposée par Gäumann (19) pour certaines phytotoxines.

Cette activité flétrissante de la lycomarasmine, semble due selon Gäumann (19) à la formation de complexes avec les ions ferriques (3).

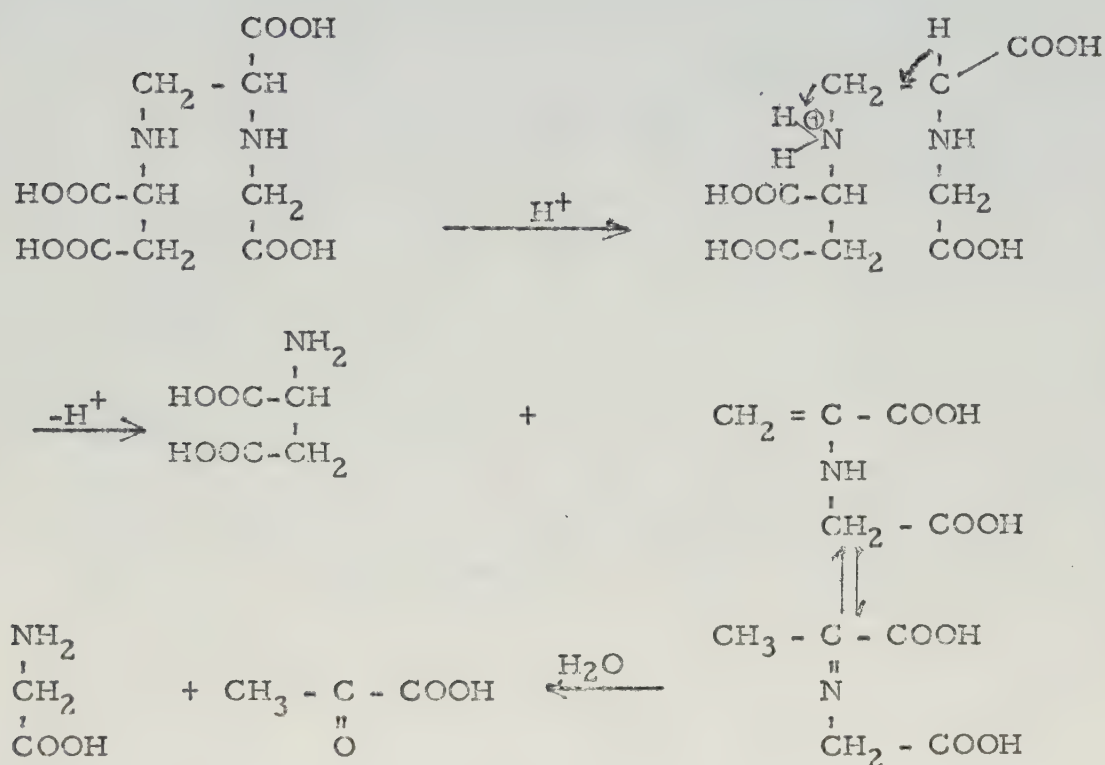
La lycomarasmine est un agent complexant. Il existe d'ailleurs une analogie de structure entre les marasmines et certaines substances complexantes telles que l'acide nitriloacétique (V) et l'acide éthylène diamine tétraacétique (VI).



L'hydrolyse acide énergique de la lycomarasmine libère par un mécanisme de β -élimination (18) de l'acide aspartique et du glycocolle. Ce comportement au cours de l'hydrolyse acide caractérise les marasmines. En effet les autres acides iminés sont très stables en pH acide (voir ci-dessus). Un mécanisme rendant compte de l'hydrolyse particulière de ces marasmines a été proposé par Lederer (20) pour l'aspergillomarasmine B (VII): il y aurait protonation d'un $-\text{NH}$, suivie d'une β -élimination (Tableau II). Ce mécanisme peut être appliqué à différentes marasmines et en particulier à la lycomarasmine.

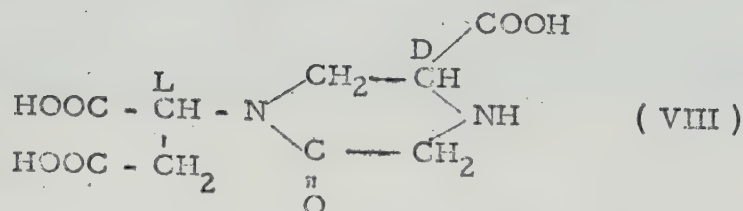
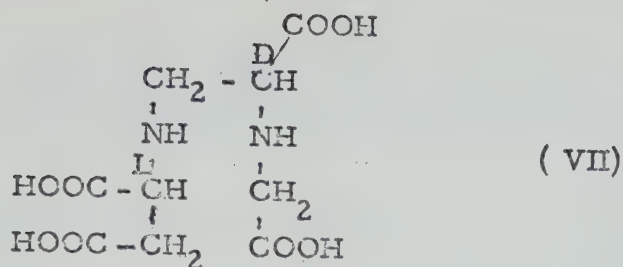
La β -élimination conduit à la libération d'acide aspartique et d'une énamine qui s'isomérisent en base de Schiff et donne par hydrolyse du glycocolle et de l'acide pyruvique.

TABLEAU II



La structure de la lycomarasmine a été établie par Hardegger et coll. (18) grâce à la résonance magnétique nucléaire.

La lycomarasmine donne en milieu faiblement alcalin l'acide lycomarasmique (VII). En milieu fortement alcalin ou acide, il y a cyclisation en acide anhydro-lycomarasmique ou substance J (VIII).



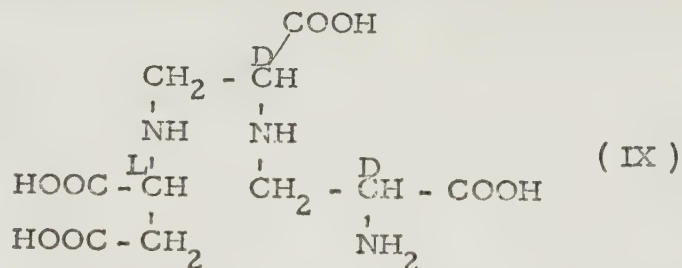
b) Les aspergillomarasmines:

1) Isolement et propriétés:

Les aspergillomarasmines A, B et C furent isolées de l'Aspergillus flavus oryzae, et leurs structures établies par Barbier et coll. (21, 22, 23).

L'identité de l'aspergillomarasmine B (VII) avec l'acide lycomarasmique et de l'aspergillomarasmine C avec l'acide anhydrolycomarasmique (VIII) a été établie.

L'aspergillomarasmine A a la structure (IX).



Les aspergillomarasmines possèdent la même activité flétrissante par perturbation du métabolisme de l'eau de la plante, que la lycomarasmine. Cette activité est renforcée par la présence d'ions ferriques.

Robert (24) a étudié l'activation ou l'inhibition de certains systèmes à catalyseur métallique, par les marasmines. Ce travail a permis de mettre en évidence le pouvoir antioxydant de l'aspergillomarasmine B.

Cette marasmine inhibe l'oxydation catalysée par le Cu^{++} , de l'acide ascorbique, des fonctions thiols de la cystéine, de la caséine et de la sérumalbumine.

Elle inhibe également la formation des peroxydes lipidiques dans les homogénats hépatiques, et l'activité peroxydasique de l'hémoglobine et du complexe hémoglobine-haptoglobine, en fonction de la nature de l'accepteur utilisé (l'acide ascorbique provoquant l'inhibition la plus forte).

Enfin elle a une influence sur le métabolisme des acides nucléiques d'Escherichia coli B, en augmentant le taux d'azote des bactéries.

2) Synthèses :

De nombreux essais de synthèse des aspergillomarasmines ont été effectués.

Les premiers essais furent ceux de Liechti (25). Cet auteur propose deux schémas de synthèse de l'aspergillomarasmine B (Tableaux III et IV). Aucune de ces tentatives de synthèse n'a abouti au produit escompté. (nous représentons en traits pleins sur les schémas, les réactions ayant pu être accomplies avec succès par Liechti et en traits pointillés l'hypothèse de travail qui n'a pu être réalisée).

Après les résultats négatifs de Liechti, Hardegger et coll. (26), ont réussi une synthèse de l'anhydroaspergillomarasmine B par condensation du diester de l'acide aspartique et de l'ester α -chloré de l'acide acrylique (Tableau V).

Récemment, (27, 28), Hardegger a proposé une synthèse de l'anhydroaspergillomarasmine B à partir de l'acide aspartique ou de la L-asparagine. Seul l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique ou son ester méthylique a pu être obtenu quels que soient les composés intermédiaires utilisés (Tableau VI) (traits pleins pour les réactions accomplies avec succès, traits pointillés pour celles n'ayant pu être réalisées).

TABLEAU III

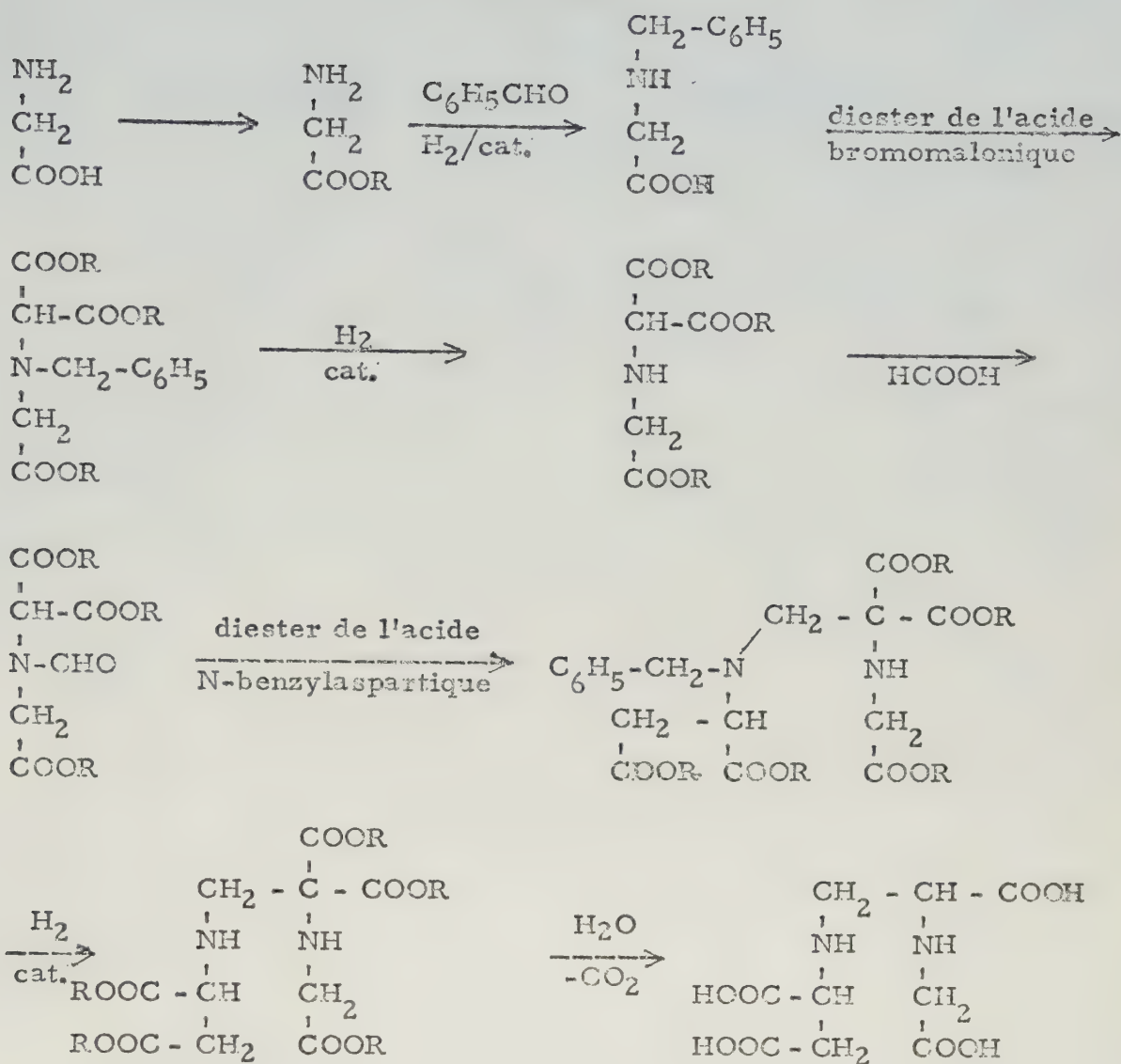


TABLEAU IV

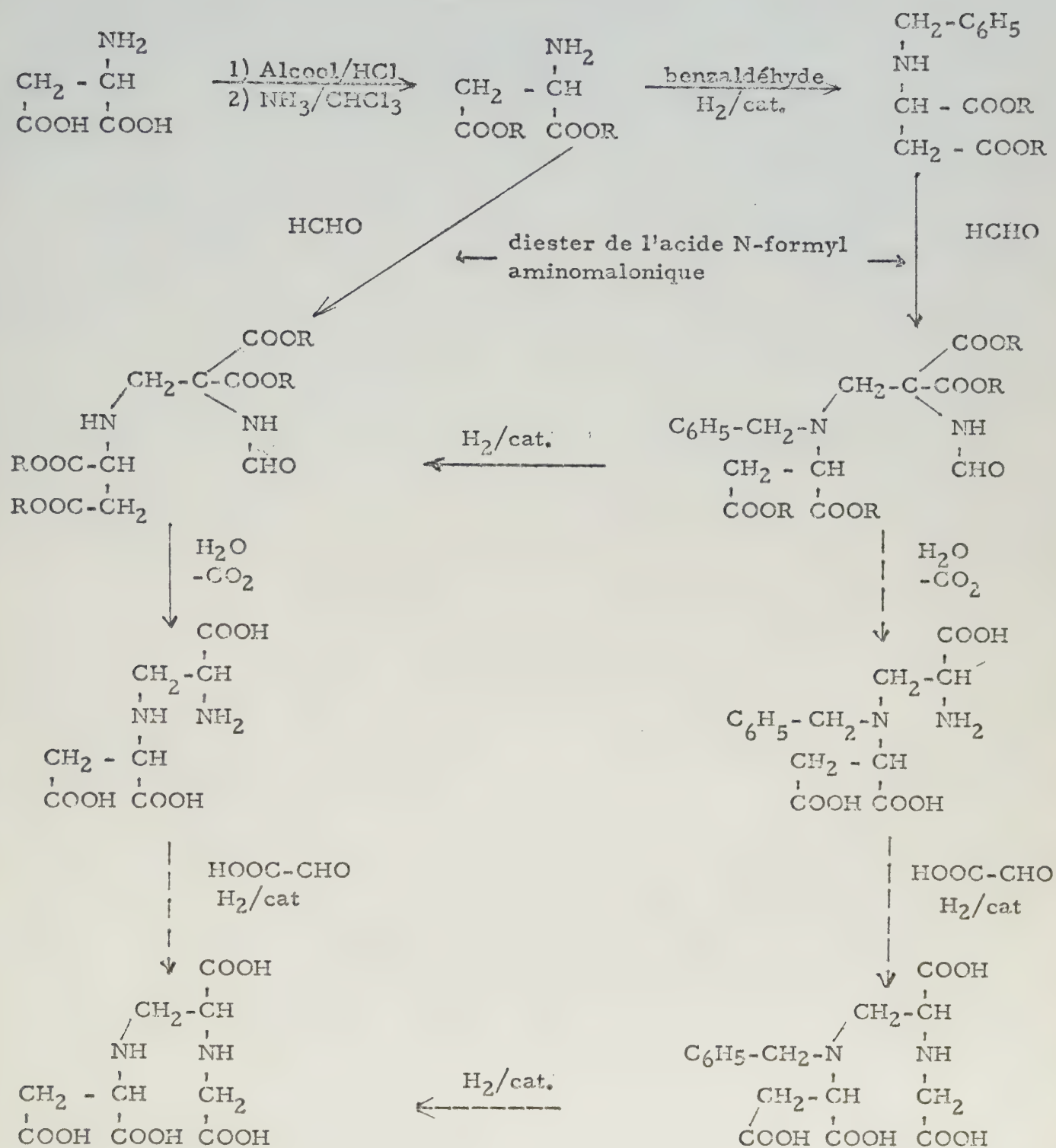


TABLEAU V

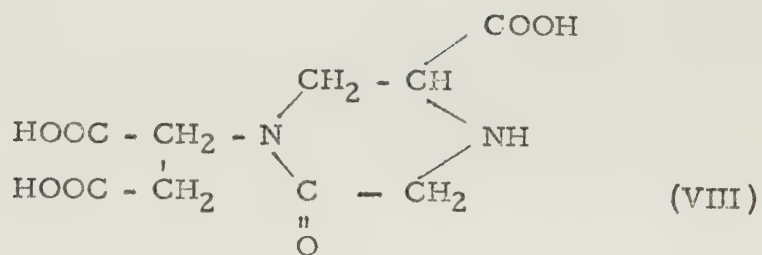
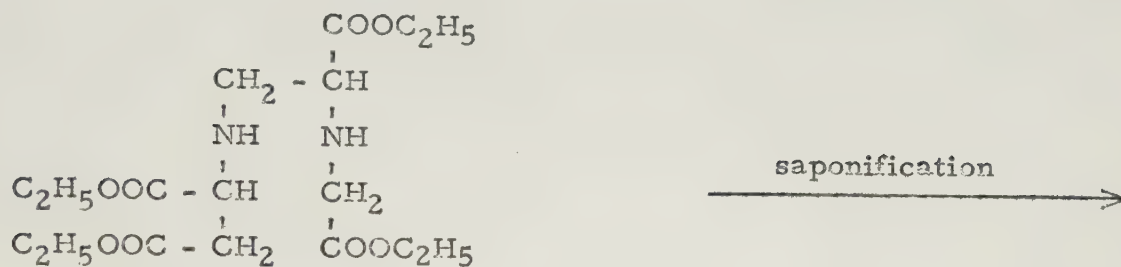
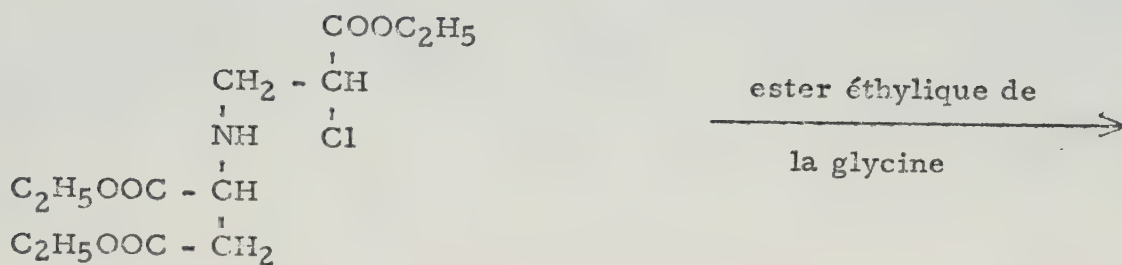
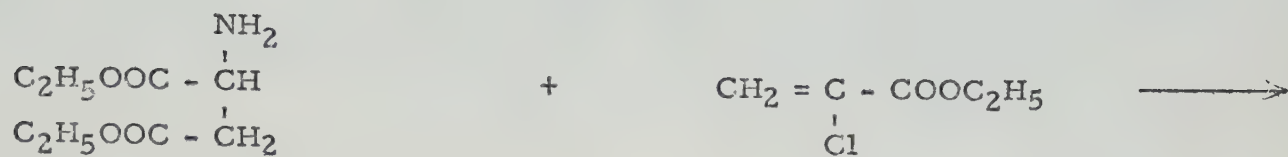
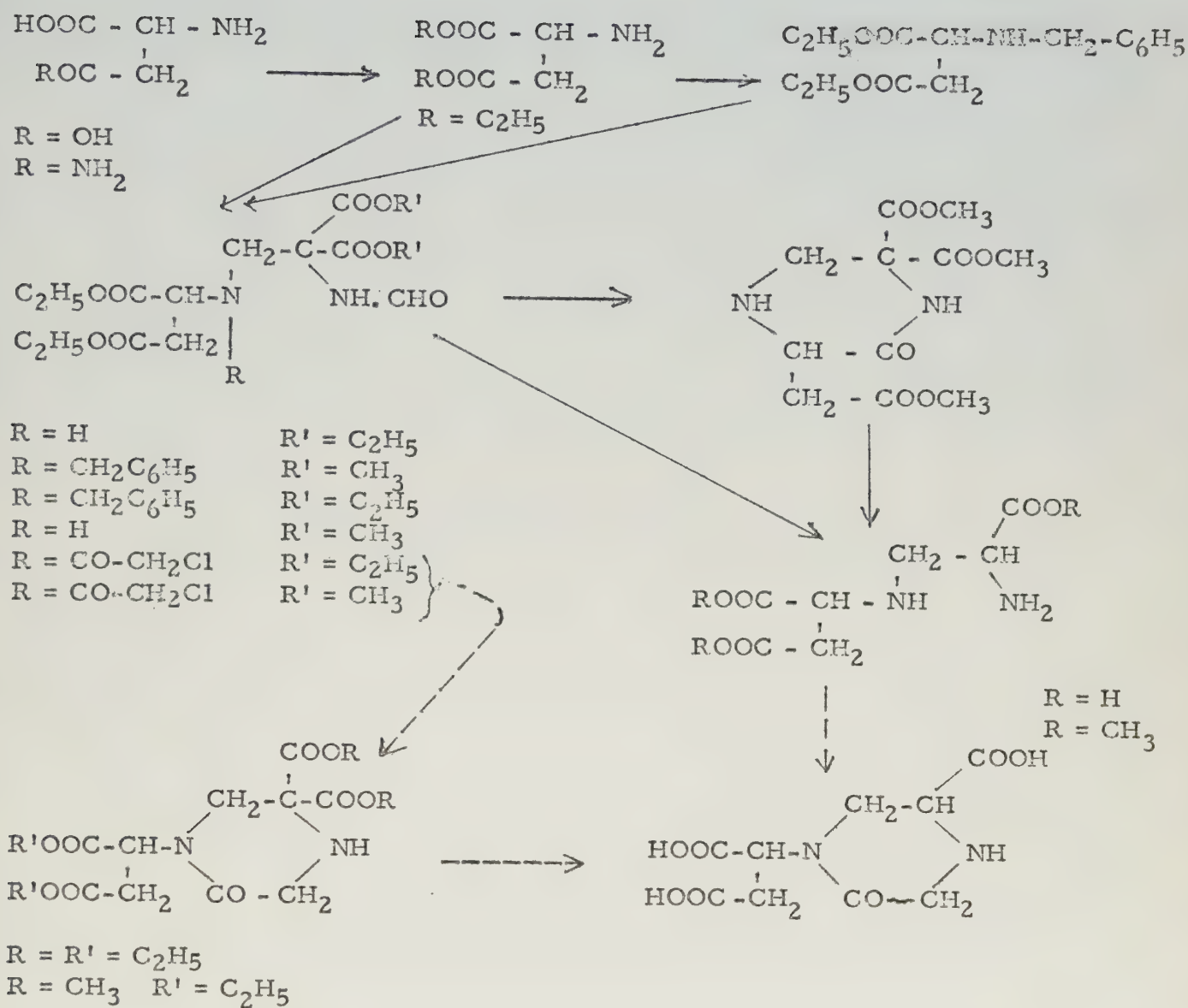


TABLEAU VI

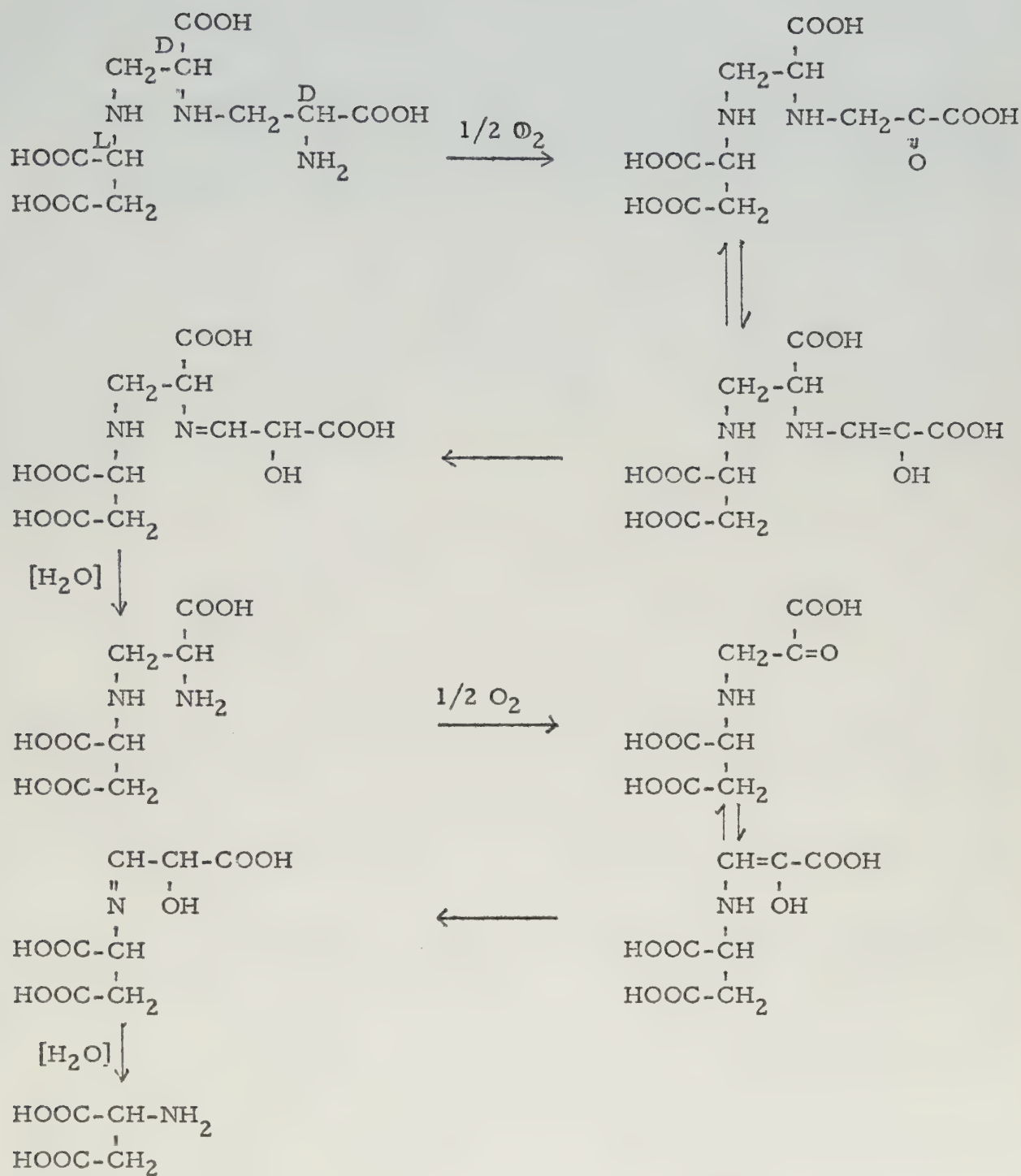


3) Stéréochimie:

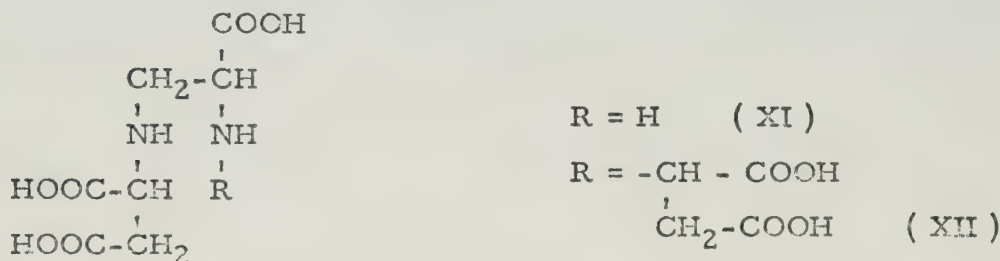
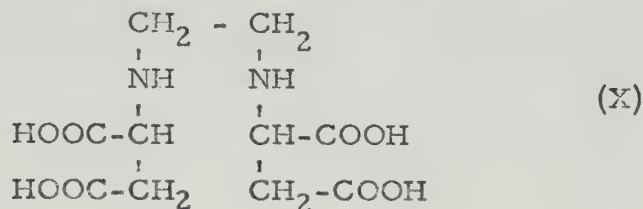
Les aspergillomarasmines A et B(IX) et(VII) possèdent la configuration L (S) pour le carbone asymétrique de l'acide aspartique. Pour établir la configuration de l'autre centre asymétrique de l'aspergillomarasmine B et des deux autres centres de l'aspergillomarasmine A, il a été nécessaire de faire appel à l'oxydation par une aminoacide oxydase (22). La D-aminoacide oxydase, produite par Aspergillus ustus et décrite par Sakaguchi et coll. (29), a été incubée avec des quantités équimoléculaires d'aspergillomarasmine d'une part et d'acides L et D aspartique d'autre part. L'aspergillomarasmine A consomme deux fois plus d'oxygène que l'acide D-aspartique. Une explication de ce phénomène qui conduit à la formation d'acide aspartique se trouve résumée dans le Tableau VII. Une première oxydation conduit à un céto-acide, qui s'énolise, puis s'isomérisé en base de Schiff. Cette base de Schiff, après hydrolyse est oxydée une deuxième fois en un céto-acide, qui s'énolise, s'isomérisé en base de Schiff et donne, après hydrolyse, l'acide aspartique. Comme on est parti d'une D-aminoacide oxydase et que l'acide aspartique est de forme L, on peut attribuer à l'aspergillomarasmine A la configuration LDD (SRR).

Il est probable que l'aspergillomarasmine B a la même stéréochimie soit LD (SR) d'autant plus qu'il semble qu'elle soit formée à partir de l'aspergillomarasmine A.

TABLEAU VII



Dans le présent travail, nous décrivons une synthèse de l'aspergillomarasmine B racémique (acide lycomarasmique VII) (30), ainsi que les synthèses de trois analogues: l'acide éthylène-N, N'-diaspartique (X) (31), l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique (XI) et l'acide diaspartyl-2, 3 propionique (XII) (32).



La préparation de ces analogues a permis de mettre au point les techniques conduisant à la synthèse de l'aspergillomarasmine B elle-même. Elle a également permis d'étudier leurs propriétés chimiques, ainsi que leurs comportements en spectrométrie de masse.

Nous avons montré l'identité du produit de synthèse avec l'aspergillomarasmine B naturelle.

L'aspergillomarasmine B de synthèse, de même que les trois analogues préparés, sont biologiquement actifs dans les essais de flétrissement sur des feuilles de tomates.

PRINCIPALES TECHNIQUES
UTILISEES

A - METHODES DE SEPARATION.

Chromatographie:

La chromatographie sur papier (méthode ascendante ou descendante) a été utilisée pour vérifier l'homogénéité des produits et déterminer la nature des différents produits d'hydrolyse. Comme support nous avons utilisé un papier Whatman n°1. Les chromatogrammes, développés et séchés, ont été révélés à l'aide d'une solution de ninhydrine à 0,1 % dans le butanol et en chauffant à 60 ou 100°.

La chromatographie sur colonne, soit de poudre de cellulose, soit d'acide silicique, a été employée comme méthode de purification pour certains composés intermédiaires de synthèse.

Electrophorèse:

Au cours de ce travail, nous avons utilisé de façon constante l'électrophorèse sur papier, à la fois comme méthode analytique, et comme méthode préparative.

Nous avons employé un appareil L. K. B. (Réf. n°3276 B) et effectué les électrophorèses sur papier Whatman 3 MM (300 volts, 50 mA, soit 2 volts/cm), durant 4 heures et avec un tampon à pH 6,4 (pyridine-acide acétique-eau, 100:4:900). Les feuilles de papier une fois séchées, de même que les chromatogrammes, ont été révélés à l'aide d'une solution de ninhydrine.

B - TECHNIQUES ANALYTIQUES DIVERSES.

Analyses élémentaires:

Les microdosages de carbone, d'hydrogène et d'azote, ont été effectués dans les laboratoires de microanalyse de la Ciba (Bâle) et au service central de microanalyse du C. N. R. S. à Gif-sur-Yvette.

Points de fusion:

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un appareil de Kofler qui donne les températures corrigées.

Pouvoirs rotatoires:

Nous avons mesuré les pouvoirs rotatoires à l'aide d'un polarimètre électronique "Quick Polarimètre" Roussel et Jouan en lumière monochromatique, raie D du sodium.

C - TECHNIQUES SPECTROMETRIQUES.

Spectres ultra-violet:

Les spectres ultra-violet ont été mesurés à l'aide d'un appareil "UV-cord 202" de Perkin Elmer.

Spectres de résonance magnétique nucléaire:

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été mesurés sur un appareil "Varian A 60" à la fréquence de 60 Mc. Le solvant utilisé a été l'eau lourde, et les déplacements chimiques exprimés en ppm ou en cps sont comptés à partir de la raie du tétraméthylsilane prise comme référence.

Spectrométrie de masse:

La spectrométrie de masse permet de déterminer le poids moléculaire d'un composé et fournit de nombreuses indications sur son squelette carboné et ses groupements fonctionnels.

L'allure du spectre permet de contrôler la pureté de la substance à étudier.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé de façon constante la spectrométrie de masse, à la fois comme méthode analytique et comme méthode de contrôle.

Nous donnons à titre d'exemple quelques fragmentations d'acides aminés simples, ces mécanismes de fragmentations étant utiles à la compréhension des spectres de masse des aspergillomarasmines et de leurs dérivés.

a) Préparation des esters d'acides aminés (33, 34):

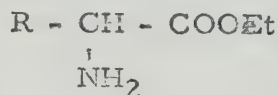
Les mesures ont été effectuées sur 1 à 2 mg de substance portés au reflux du méthanol contenant 10 % d'acide chlorhydrique, durant 2 heures. Après avoir amené à sec sous vide, on reprend le résidu par le chlorure de méthylène et on libère la base par passage d'un courant sec d'ammoniac. Par filtration la solution est débarrassée du chlorure d'ammonium et amenée à sec sous vide sans chauffer. L'ester est introduit à 160° dans un spectro-

mètre (Atlas CH₄). La température de la source d'ions était de 260° et la tension d'ionisation de 70 eV.

b) Généralités sur le comportement des esters d'acides aminés en spectrométrie de masse (35, 36, 37, 38):

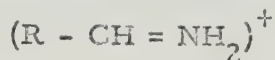
Dans un spectre de masse d'ester d'acide-amino, en plus du pic attendu pour la masse moléculaire, on constate la présence de pics correspondant aux fragmentations.

En effet si l'on considère la formule générale d'un ester d'acide-amino

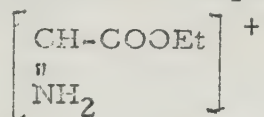


on a

- un pic moléculaire à $m/e = M$ (et $M + 1$)
- un pic de base correspondant à la perte de COOEt soit:



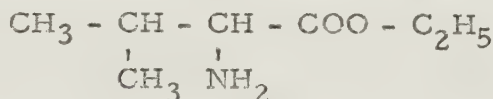
- un pic d'amine correspondant à la perte de la chaîne, soit:



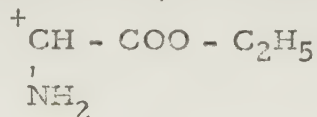
On a également des pics correspondant à la perte de Et et OEt.

On trouvera ci-dessous quelques exemples de coupures particulières d'acides-amino tels que la valine, la phénylalanine et la lysine.

1) Spectre de masse de l'ester éthylique de la valine:

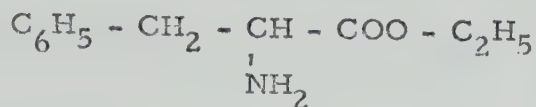


Après le pic moléculaire qui est parfois peu intense, le premier pic observé est le pic d'amine à $m/e = 102$ correspondant à

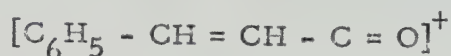


On observe ensuite le pic de base, le plus haut du spectre à $m/e = 72$ et correspondant à la perte de $-\text{COO}-\text{C}_2\text{H}_5$.

2) Spectre de masse de l'ester éthylique de la phénylalanine:

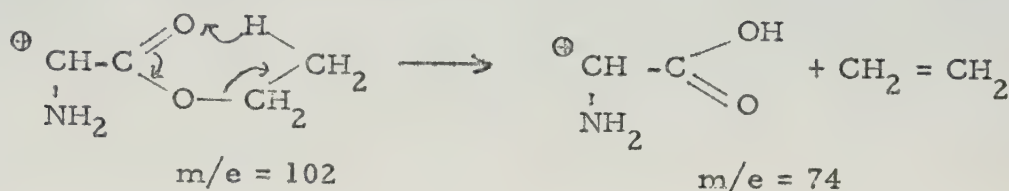


Après le pic moléculaire $M = 193$ (et $193 + 1 = 194$) on constate la présence d'un pic à $m/e = 131$ correspondant à l'ion cinnamoyl soit:



Le pic de base à $m/e = 120$ correspond à l'ion $(\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{NH}_2)^+$ et le pic d'amine à $m/e = 102$ correspond à l'ion $(\text{NH}_2 - \text{CH} - \text{COOC}_2\text{H}_5)^+$

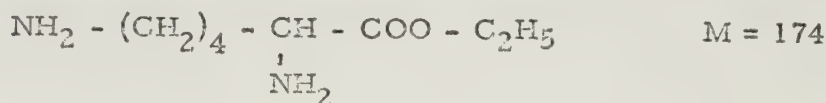
Le pic à $m/e = 102$ est toujours accompagné d'un pic à $m/e = 74$ formé par élimination d'éthylène:



Les pics à $m/e = 77$ et 91 correspondent respectivement au noyau $(\text{C}_6\text{H}_5)^+$ et à l'ion tropylium $(\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2)^+$.

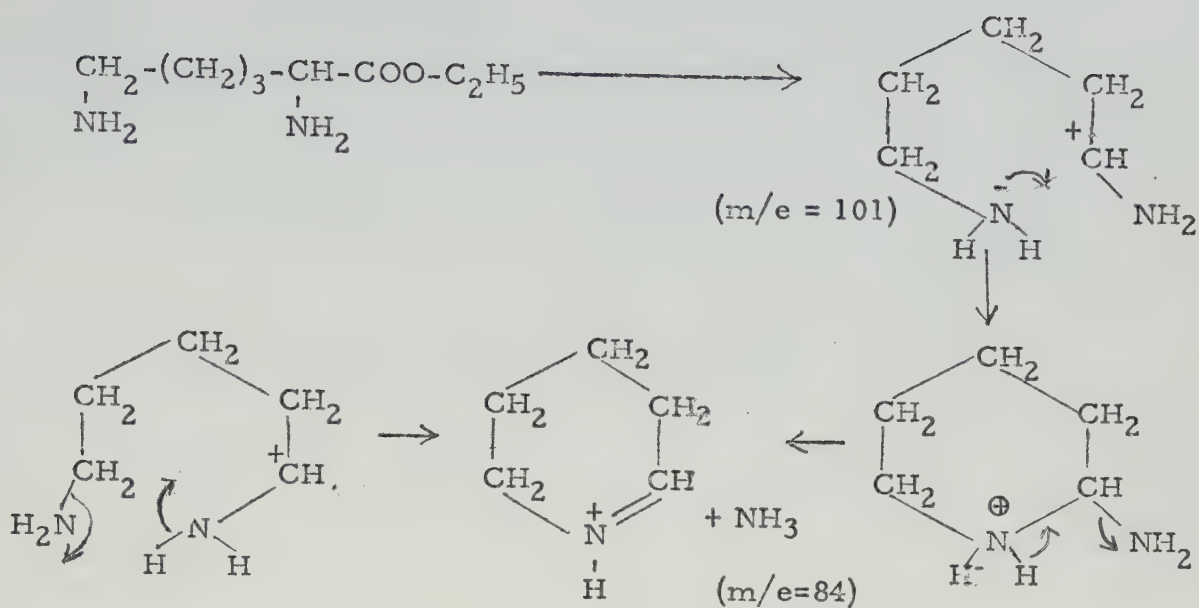
Le pic à $m/e = 29$ correspond au groupe éthyle du fragment ester.

3) Spectre de masse de l'ester éthylique de la lysine:



Après l'ion moléculaire à $m/e = 174$, on constate la présence d'un pic à $m/e = 157$ correspondant vraisemblablement à la perte de NH_3 .

Mais la perte de NH_3 se produit principalement après le départ du groupement ester, car le pic de base à $m/e = 101$ est très faible alors que le pic le plus haut du spectre est à $m/e = 84$ et correspond à la perte de NH_3 à partir de $m/e = 101$.



D - TESTS BIOLOGIQUES.

Des feuilles de tomates de taille à peu près semblable ont été utilisées pour les tests d'activité. La feuille est placée dans un tube contenant la solution à étudier, additionnée de chlorure ferrique (3 mg/100 ml) et l'on note au bout de 12, 24 et 48 heures l'état de la feuille en prenant soin de maintenir constant le niveau du liquide.

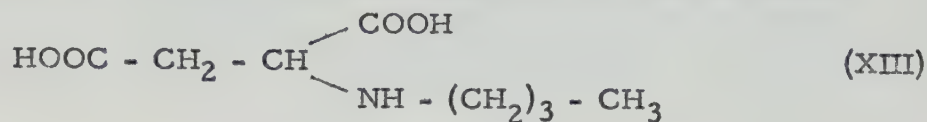
Les solutions à étudier ont été faites avec de l'eau du robinet, le pH étant ajusté à 7 avec de la soude 0,1 N lorsque c'était nécessaire.

EXPOSE DE NOS PROPRES TRAVAUX

I - PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I

Synthèse de l'acide N-butyl-D.L.-aspartique.

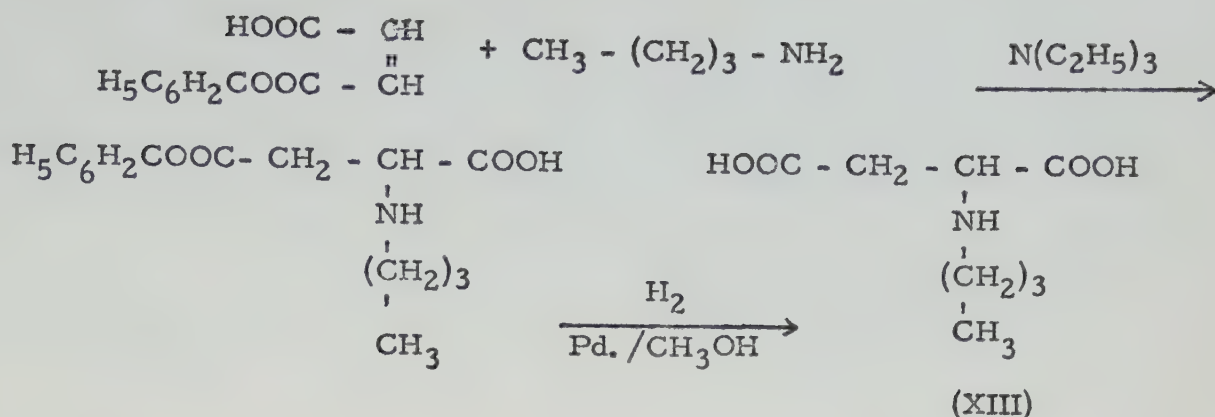


Au cours d'un premier essai, nous avons tenu à répéter la synthèse d'acides N-alkyl aspartiques, telle qu'elle était décrite par Laliberté et Berlinguet (39). Cette synthèse, qui est une modification de la technique de condensation du monomaléate de méthyle selon Zilkha et Bachi (40), permet la préparation d'acides aspartiques N-substitués.

Les techniques jusqu'à présent décrites, utilisaient le monomaléate de méthyle. Les molécules auxquelles nous devions aboutir sont, par suite de la présence d'un carboxyle en β d'un groupement aminé, sujettes à un mécanisme de β élimination en pH fortement acide ou fortement alcalin. Il devenait donc nécessaire de répéter un essai de condensation avec le monomaléate de benzyle (on sait que la libération des esters benzyliques se fait très facilement par hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon). Lors de ce premier essai nous avons utilisé comme amine la N-butylamine.

1- Synthèse.

Le monomaléate de benzyle a été préparé par chauffage de l'anhydride maléique au reflux de l'alcool benzylique. La condensation est ensuite effectuée sur la N-butylamine, dans les conditions décrites par Laliberté et Berlinguet (39) et en présence de méthanol absolu. Les différents essais de cristallisation de l'ester benzylique de l'acide N-butyl aspartique n'ayant pas réussi, l'hydrogénolyse a été effectuée sur un produit amorphe. L'acide N-butyl aspartique, F. 160-162°, est obtenu avec un rendement de 76 %.



2- Structure.

L'analyse élémentaire de l'acide N-butyl aspartique (XIII) est en accord avec la formule brute $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_4$. Comme on pouvait s'y attendre, un essai d'hydrolyse acide n'a pas conduit à la libération d'acide aspartique. Ce résultat est en accord avec la structure envisagée pour le produit de la réaction qui ne doit pas être hydrolysé dans ces conditions.

La spectrométrie de masse du diester éthylique (figure 1) est en accord avec la masse moléculaire attendue (pic de masse à $m/e=245$ et 246).

En plus du pic moléculaire, on observe la présence d'un pic important à $m/e = 172$ correspondant à la perte de $-\text{COO}-\text{C}_2\text{H}_5$ et d'une série de pics à $m/e = 172, 158, 144, 130, 126, 100$ et 84 pouvant correspondre à la fragmentation indiquée dans le Tableau VIII.

L'étude du spectre de masse de l'ester de l'acide N-butyl aspartique confirme donc la structure attendue pour ce composé.

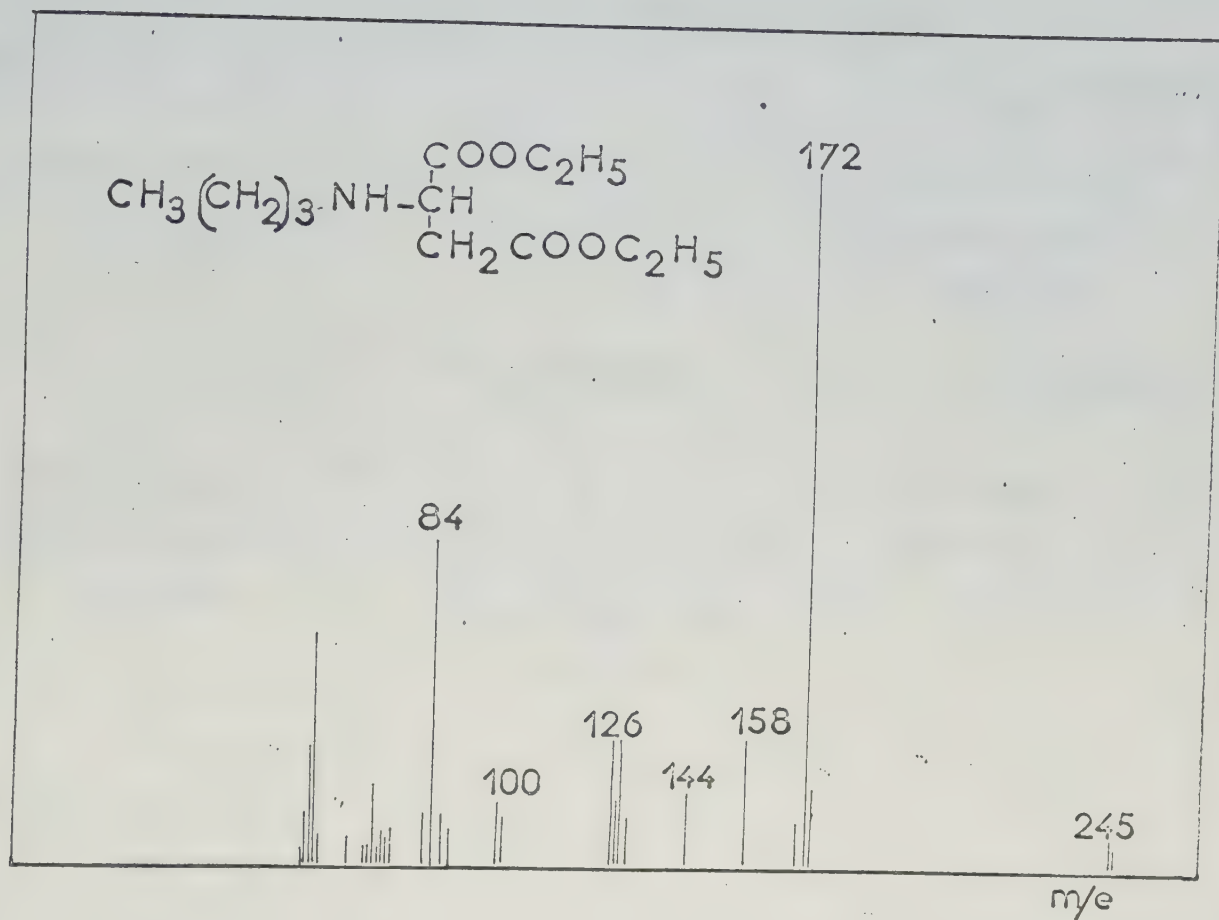
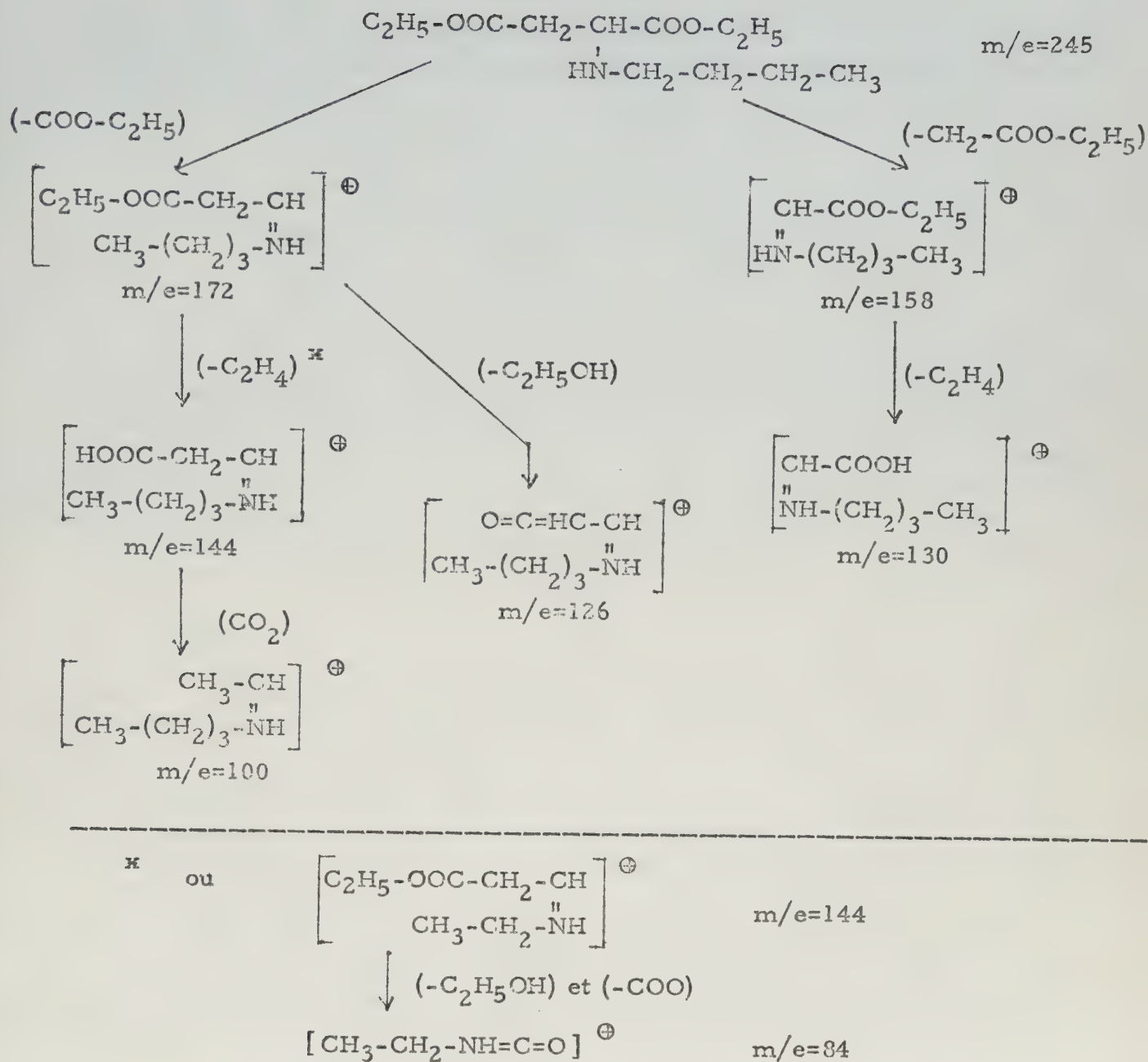


Figure 1

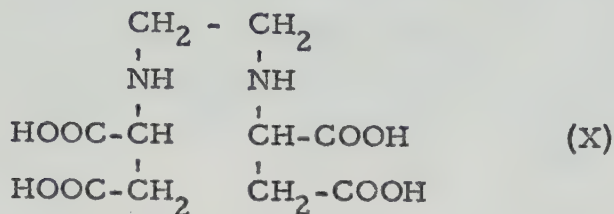
Spectre de masse partiel du diester, éthylique de
l'acide N-butylaspartique.

TABLEAU VIII



CHAPITRE II

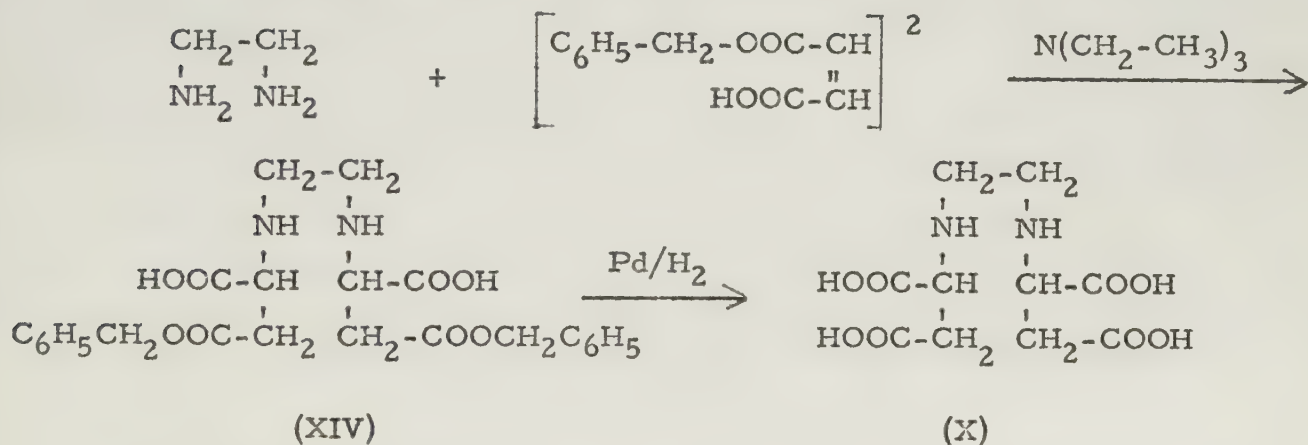
Synthèse et propriétés de l'acide DL-éthylène-N, N'-diaspartique.



Après avoir étudié (Chapitre I) les conditions de la condensation du monomaléate de benzyle sur la N-butylamine, nous avons répété la même réaction sur une diamine-1, 2: l'éthylène diamine. Cette réaction permet d'accéder à une molécule intéressante qui possède deux groupes aspartyles fixés sur deux carbones voisins. La structure d'une telle molécule est voisine de celle de la lycomarasmine et des aspergillomarasmynes. De plus cette molécule est susceptible de donner des complexes avec le fer ferrique, complexes biologiquement actifs dans les tests de flétrissement de plantes.

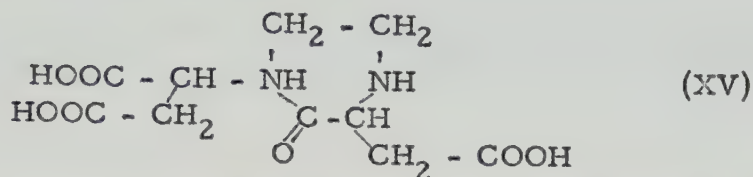
1 - Synthèse.

Le monomaléate de benzyle a été condensé sur l'éthylène diamine en présence de triéthylamine.



Après purification du produit de condensation et cristallisation on obtient des cristaux F. 86-88°, dont l'analyse élémentaire correspond bien à la formule brute $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$.

L'hydrogénolyse de cet ester benzylique (XIV) permet d'obtenir après cristallisation, l'acide éthylène-N,N' diaspartique (X) F. 128-132° avec un rendement de 86 %. L'analyse élémentaire concorde avec la formule brute $C_{10}H_{16}N_2O_8$, cependant les valeurs obtenues pour le carbone et l'hydrogène (légèrement trop élevées) indiquent qu'une partie de la substance doit exister sous forme de lactame (XV).



Le rendement total par rapport à l'éthylènediamine est de 18 %. La présence d'un maximum à 200 m μ ($\epsilon=4000$) dans le spectre ultraviolet de l'ester méthylique de l'acide éthylène N,N'-diaspartique, révèle la présence d'une liaison -CO-NH-, une partie de cet acide étant lactamisée. La possibilité peu vraisemblable, d'une condensation de deux molécules de monomaléate de benzyle sur un même groupe aminé de l'éthylène diamine se trouve éliminée par le résultat négatif d'un dosage selon Van Slyke, de même que par une réaction négative à la ninhydrine.

Notre synthèse a introduit deux carbones asymétriques dans la molécule de l'acide éthylène-N,N'-diaspartique; il est vraisemblable que la substance obtenue est un mélange des formes méso- et racémiques.

L'acide éthylène-N,N' diaspartique montre dans son spectre de RMN (mesuré dans l'eau lourde) des bandes à 2,9 et 4,2 ppm qui sont caractéristiques de protons situés en α d'un groupe -N< ou d'un groupe >C=O.

La structure (X) a, en définitive, été prouvée par la spectrométrie de masse de l'ester méthylique, de même que par l'étude des produits d'hydrolyse acide.

2 - Structure.

L'analyse élémentaire est en accord avec les résultats attendus pour la formule brute $C_{10}H_{16}N_2O_8$.

L'acide éthylène-N,N' diaspartique (X) est actif dans le test biologique de flétrissement des feuilles de tomates, à dose plus élevée que l'aspergillomarasmine B (voir Chapitre V).

La structure a principalement été établie au moyen de la spectrométrie de masse de l'ester de l'acide éthylène-N, N' diaspartique et à l'aide de l'étude des produits d'hydrolyse acide.

a) Spectrométrie de masse de l'ester méthylique de l'acide éthylène-N, N' diaspartique.

Le premier pic observé à $m/e = 316$ correspond à l'ester triméthylque de la lactame (XV) (figure 2).

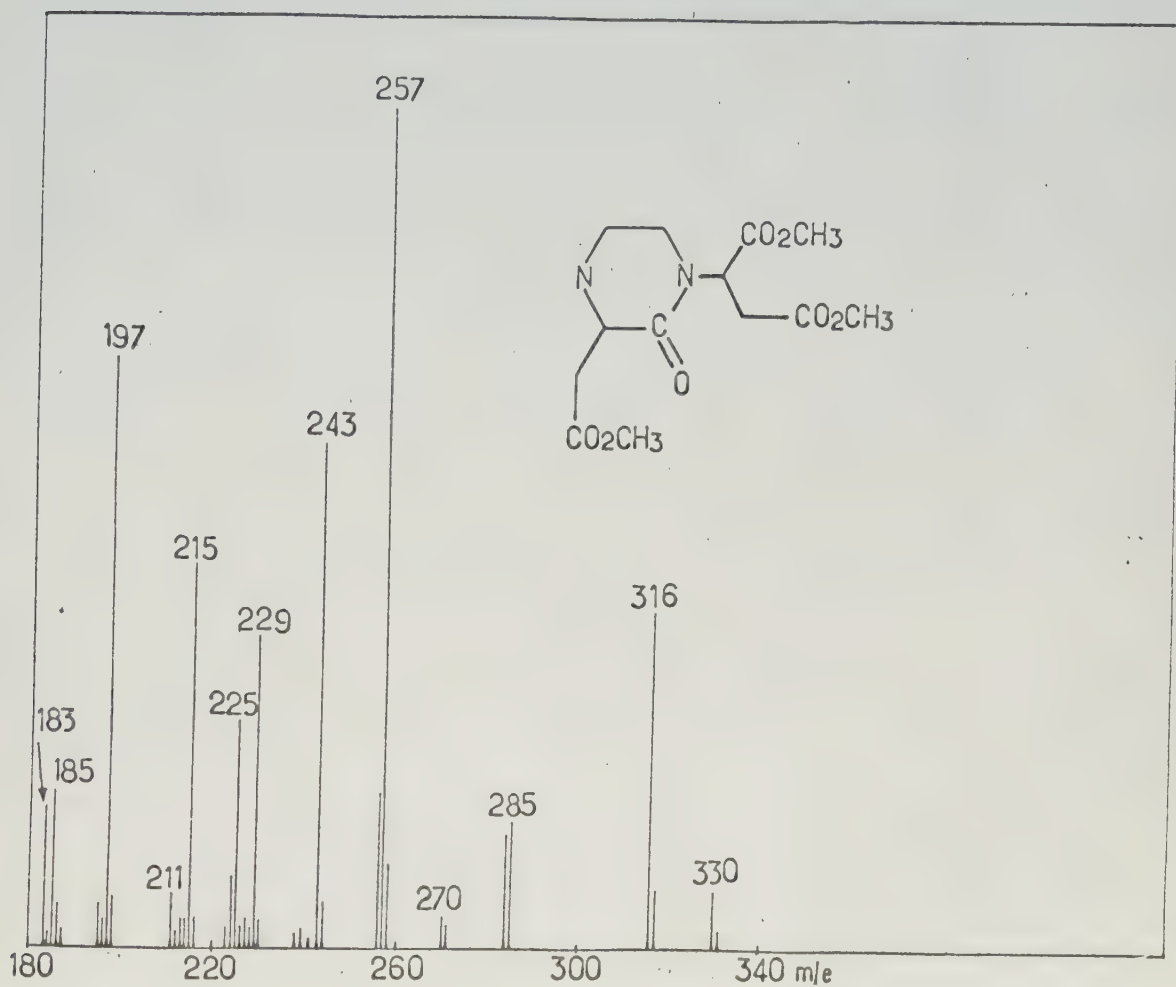


Figure 2 : Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide éthylène-N, N' diaspartique.

L'obtention de cette lactame est en accord avec ce qui a été précédemment observé en spectrométrie de masse pour les aspergillomarasmines (21, 23):

- une série de pics intenses à $m/e = 285, 284, 257, 243, 229, 215, 211, 197$ et 183 correspondent aux ions formés à partir d'une telle lactame (voir Tableau IX),
- une autre série de pics à $m/e = 330, 299, 271$, et 270 provient vraisemblablement d'une partie de la substance ayant subi une méthylation sur l'azote durant l'estérification (d'après nos observations ce phénomène se produit lors de la préparation des esters des aspergillomarasmines et de leurs dérivés),
- les pics à $m/e = 285$ et 284 représentent la perte de $O-CH_3$ et de $OH-CH_3$ à partir de l'un des trois groupes ester,
- le pic de base est situé à $m/e = 257$. Il correspond à la perte du groupe $-COO-CH_3$, fixé sur un carbone voisin de l'azote. Cette fragmentation est classique pour les esters d'acides aminés (41) de même que pour leurs dérivés (42),
- le pic à $m/e = 243$ est produit par le départ d'un groupe $-CH_2-COO-CH_3$ formant ainsi le "pic l'ester" (caractéristique des esters d'acides aminés),
- le pic à $m/e = 229$ est formé après élimination de $C = O$ de la lactame (à partir du fragment $m/e = 257$). Une telle dégradation est observable dans les spectres de masse des esters de la lactame de l'ornithine (43) et de l'eburnamnine (44),
- le pic à $m/e = 225$ est formé par perte de méthanol à partir du fragment $m/e = 257$. L'ion ainsi obtenu est comparable au pic d'amine obtenu à partir des esters de l'acide aspartique (41),
- le pic à $m/e = 197$ peut être expliqué par une combinaison des deux fragmentations précédentes, c'est-à-dire perte de CO et de méthanol,
- les pics à $m/e = 215, 221$ et 183 peuvent s'expliquer par les mêmes mécanismes, mais en partant du fragment $m/e = 243$.

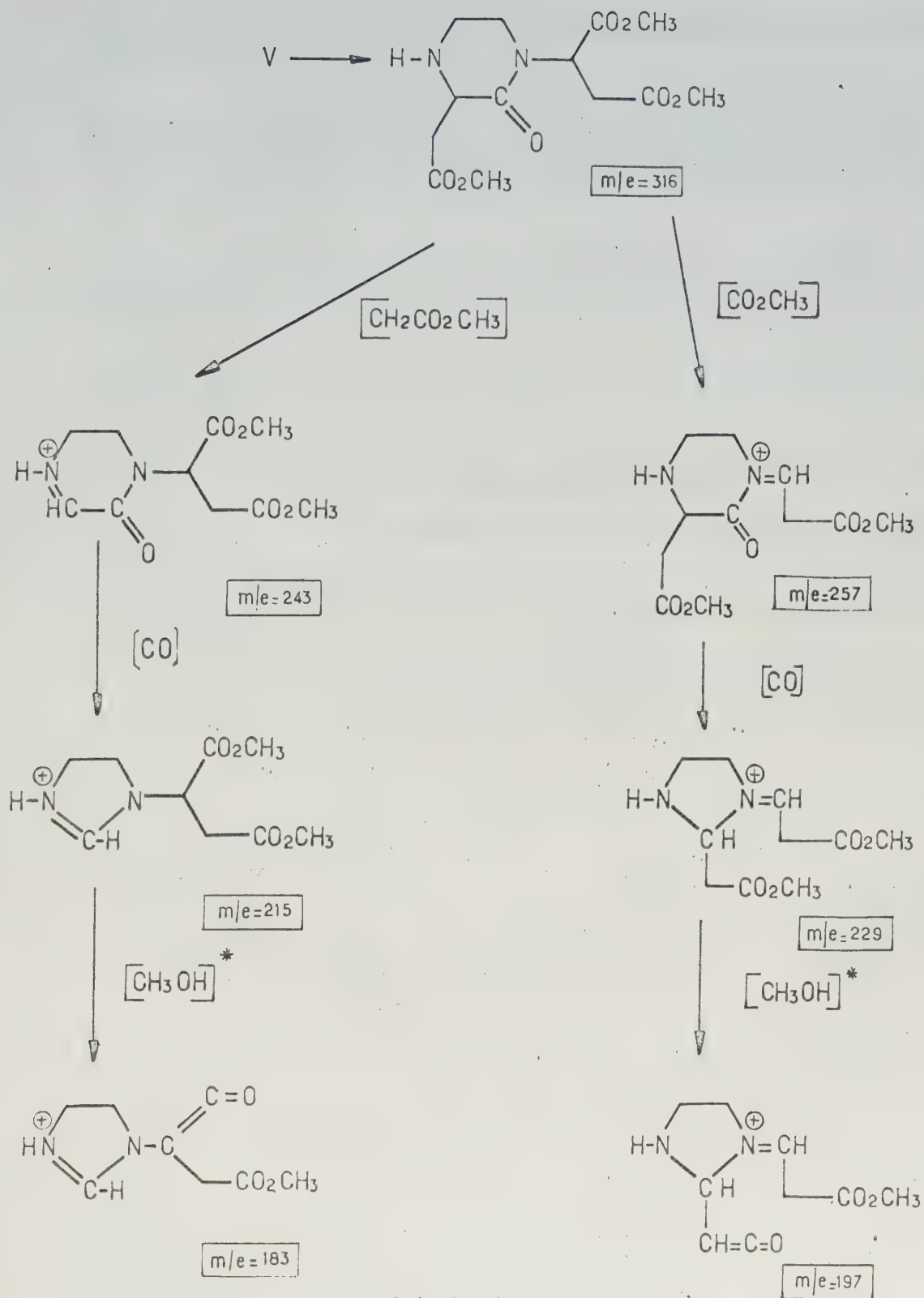


TABLEAU IX

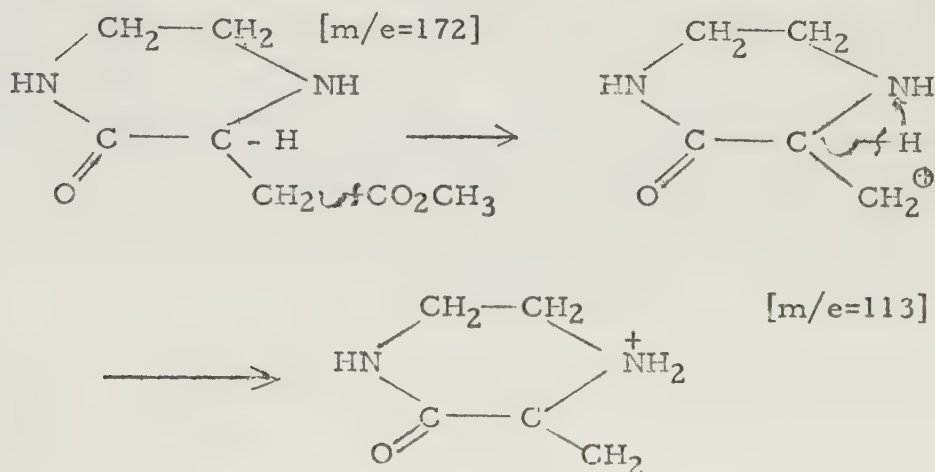
* Une seule possibilité d'élimination de ce groupe est représentée.

b) Etude des produits d'hydrolyse de l'acide éthylène-N,N'-diaspartique.

Après hydrolyse chlorhydrique énergique on n'observe aucune tache correspondant par son Rf à l'acide aspartique. En revanche, on observe la présence, par chromatographie et électrophorèse, d'une substance électriquement neutre.

Le spectre de masse d'un hydrolysats brut estérifié, montre outre les fragments provenant du produit de départ non hydrolysé, la fragmentation correspondant à cette substance neutre (Tableau X):

- le pic à $m/e = 172$ est en fait le pic de masse de la substance formée au cours de l'hydrolyse,
- le pic à $m/e = 99$, très intense, correspond à la perte de la chaîne $-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$ à partir d'une telle substance,
- le pic à $m/e = 71$ correspond à la perte de CO à partir du fragment $m/e = 99$,
- le pic à $m/e = 140$ représente l'ion moléculaire ayant perdu un ion $[\text{CH}_3\text{OH}]^+$,
- le pic à $m/e = 113$ pourrait peut-être s'expliquer par la perte du fragment ester à partir du pic moléculaire, avec réarrangement d'un hydrogène,
- la perte de CO à partir du fragment $m/e = 113$ donne le pic à $m/e = 85$.



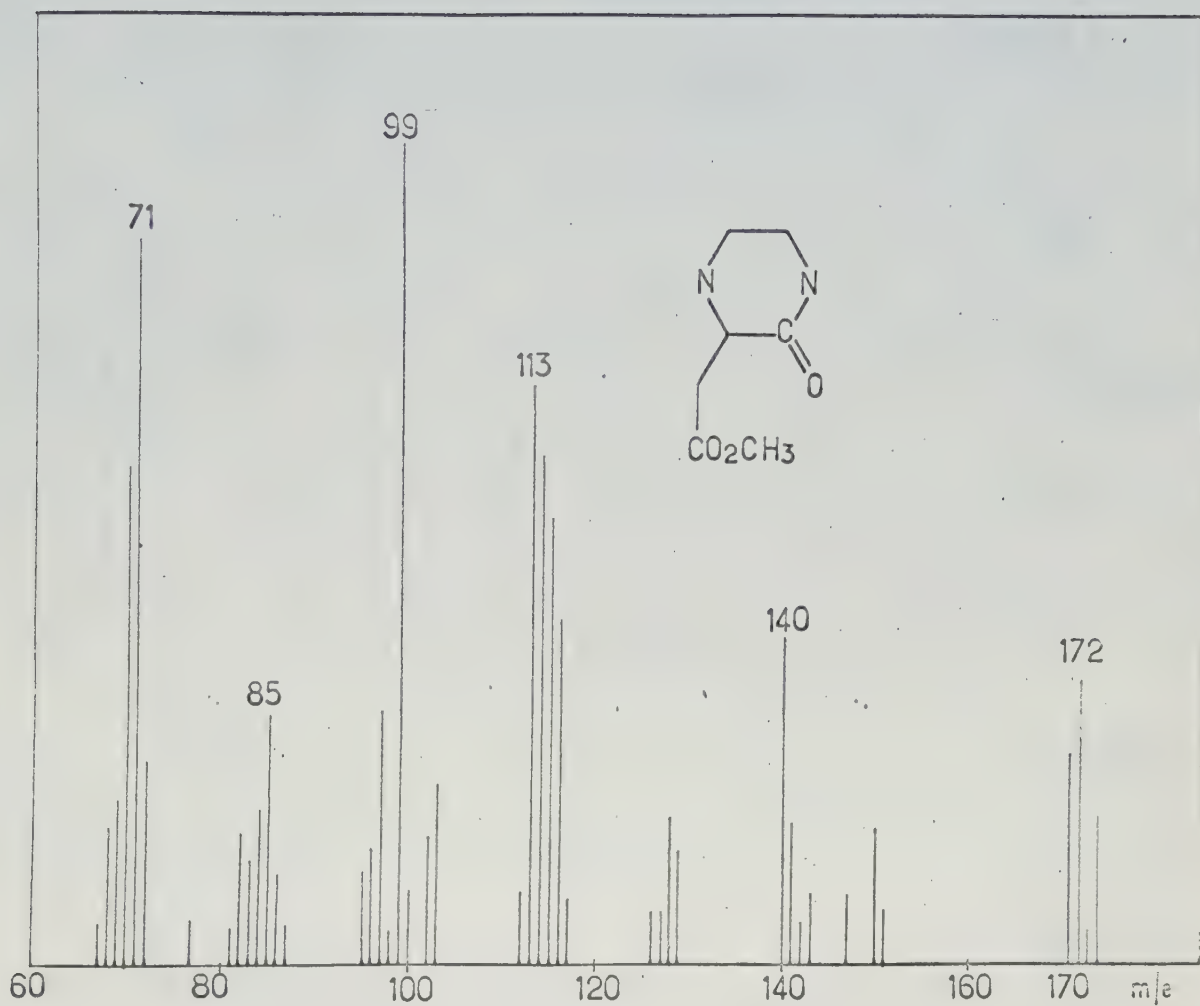


Figure 3

Spectre de masse partiel de l'ester méthylique de l'acide éthylène-N, N'-diaspartique hydrolysé.

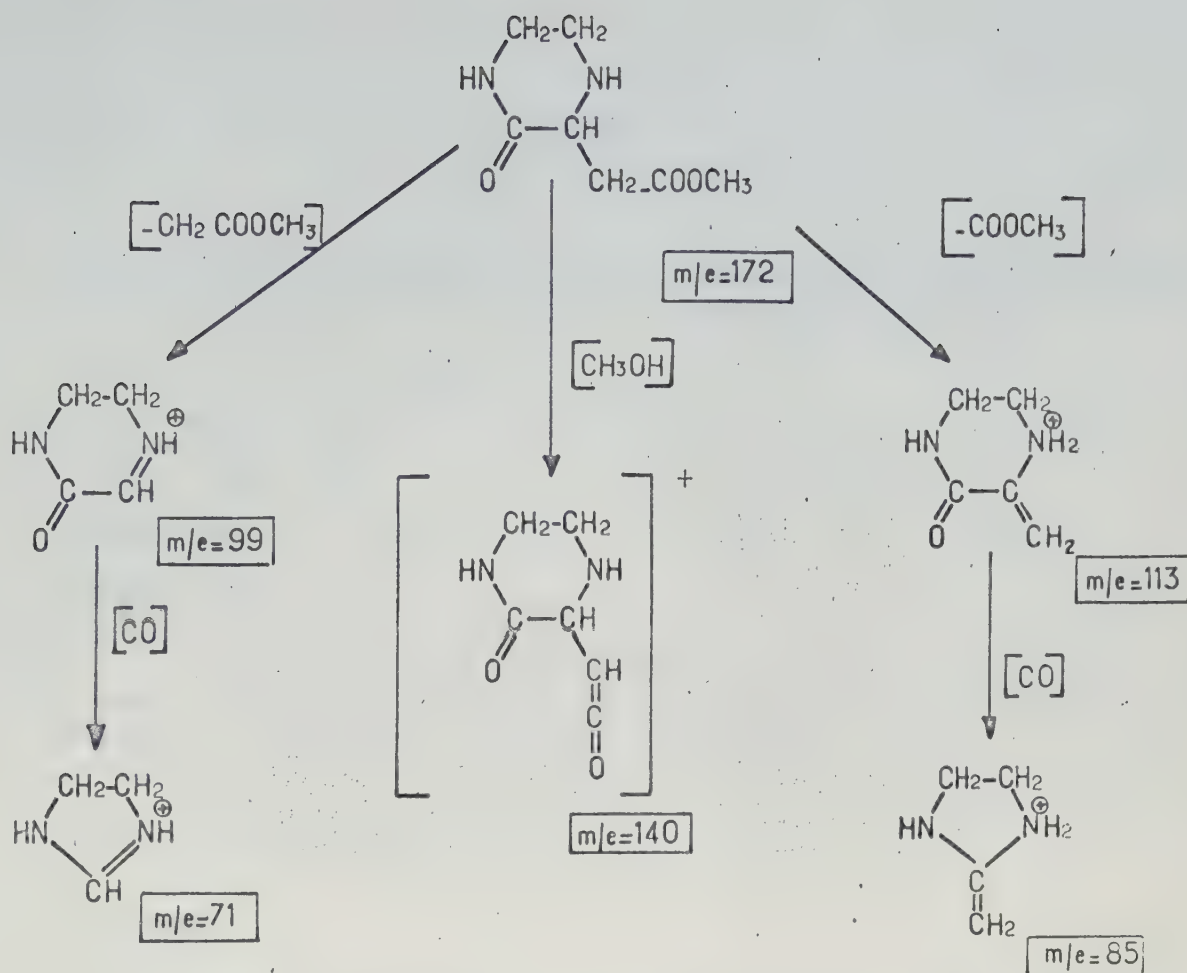
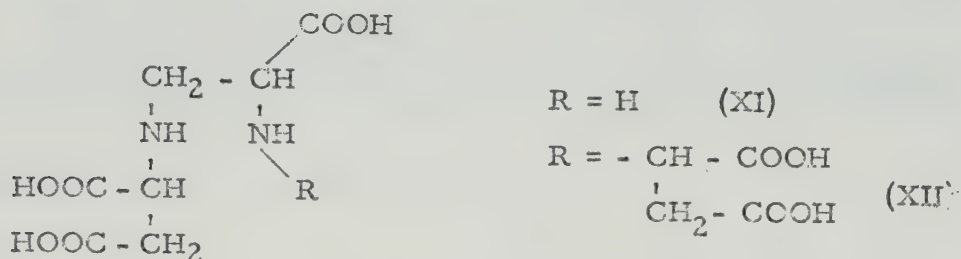


TABLEAU X

L'absence d'acide aspartique dans l'hydrolysate de l'acide éthylène-N, N'-diaspartique (confirmée par la spectrométrie de masse) apporte un élément à la compréhension du mécanisme de l'hydrolyse de la lycomarasmine et des aspergillomarasmines. En effet, c'est bien parce qu'un mécanisme de β -élimination est possible pour ces produits qu'il y a libération d'acide aspartique lors de leur hydrolyse acide. Ceci n'est pas le cas pour l'acide éthylène-N, N'-diaspartique.

CHAPITRE III

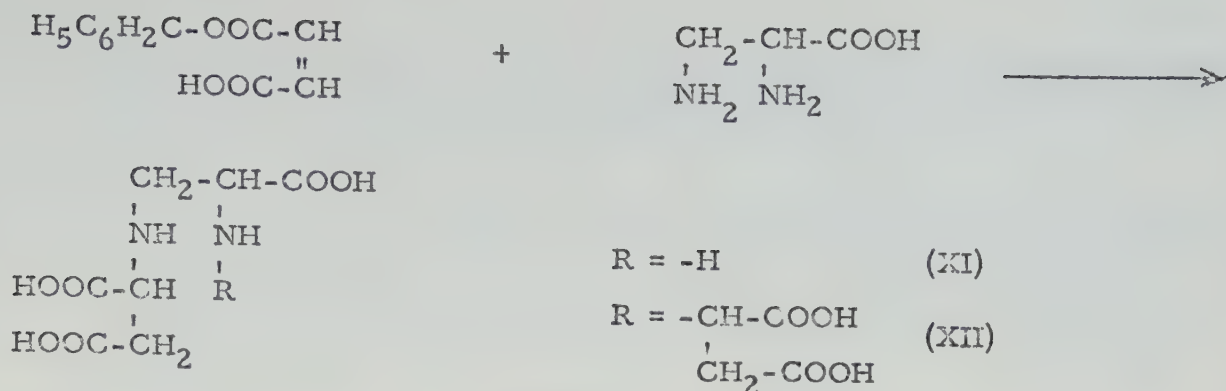
Synthèses de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique (XI)
et de l'acide diaspartyl-2, 3 propionique (XII).



La synthèse de l'acide éthylène-N, N' diaspartique nous a permis de mettre au point les conditions de condensation du monomaléate de benzyle sur une diamine-1, 2. Dans une troisième étape de notre travail, nous avons répété cette réaction sur l'acide diamino-2, 3 propionique, ce qui augmentait l'analogie des produits formés, avec la lycomarasmine et les aspergillomarasmines.

1- Synthèse.

Nous avons trouvé que la monomaléate de benzyle (45) pouvait être condensé sur l'acide D, L-diamino-2, 3 propionique (46) en présence de triéthylamine (39). Toutefois cette réaction ne se réalise pas molécule à molécule pour des raisons de non homogénéité du mélange réactionnel, mais selon les proportions de monomaléate de benzyle; on obtient après hydrogénolyse soit l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique (XI) (avec 1, 8 moles de monomaléate de benzyle pour une mole d'acide diamino-2, 3 propionique) soit l'acide diaspartyl-2, 3 propionique (XII) (avec 5, 4 moles de monomaléate de benzyle pour une mole d'acide diamino-2, 3 propionique). Au cours de ces réactions nous avons obtenu de faibles rendements en produits cristallisés: 11 % pour l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique, 8 % pour l'acide diaspartyl-2, 3 propionique. Ceci s'explique par le fait que leurs purifications nécessitent des cristallisations et des lavages répétés, au cours desquels ils se lactamisent ou s'hydrolysent partiellement à l'exemple des marasmines elles-mêmes.



Une synthèse de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique (XI) en trois étapes avait déjà été décrite en 1958 par Liechti (25).

2- Structure des composés obtenus.

La structure de ces substances a été prouvée par l'étude des produits d'hydrolyse ainsi que par la spectrométrie de masse de leurs esters.

a) Acide amino-2 aspartyl-3 propionique (XI):

L'analyse élémentaire est en accord avec la formule brute: $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$.

Cet acide F. 180-190°, réagit à la ninhydrine à 60°. Après formation d'un complexe de cuivre cette réaction à la ninhydrine disparaît, ce qui prouve la présence d'un groupement α -aminé. La plus grande basicité du groupement aminé en β de l'acide diamino-2, 3 propionique, facilite l'introduction du groupe aspartyle en β du carboxyle.

L'hydrolyse de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique (XI) par l'acide chlorhydrique libère de l'acide aspartique par un mécanisme de β -élimination comparable à celui observé pour la lycomarasmine (IV) (18), ou les aspergillomarasmies A (IX) et B (VII) (20). Après un traitement par l'acide nitreux, l'hydrolyse chlorhydrique de ce même acide (XI) libère toujours de l'acide aspartique.

Dans cette synthèse l'acide D, L-diaminopropionique a été utilisé, et un nouveau centre asymétrique a été créé; le produit de synthèse doit donc être formé du mélange des racémiques et des deux diastéréoisomères. En effet, l'électrophorèse sur papier montre que le produit de synthèse

est un mélange de deux substances de Rf très voisins. Ces deux substances ont été isolées et leurs esters méthyliques étudiés en spectrométrie de masse. Les deux spectres de masse sont identiques.

La figure 4 montre le spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique et le Tableau XI fournit l'explication des principaux pics observés (comme dans le cas de l'ester de l'acide éthylène-N, N'-diaspartique X, le pic moléculaire correspond au produit de lactamisation, avec perte d'une molécule de méthanol dès l'introduction de la substance dans l'appareil).

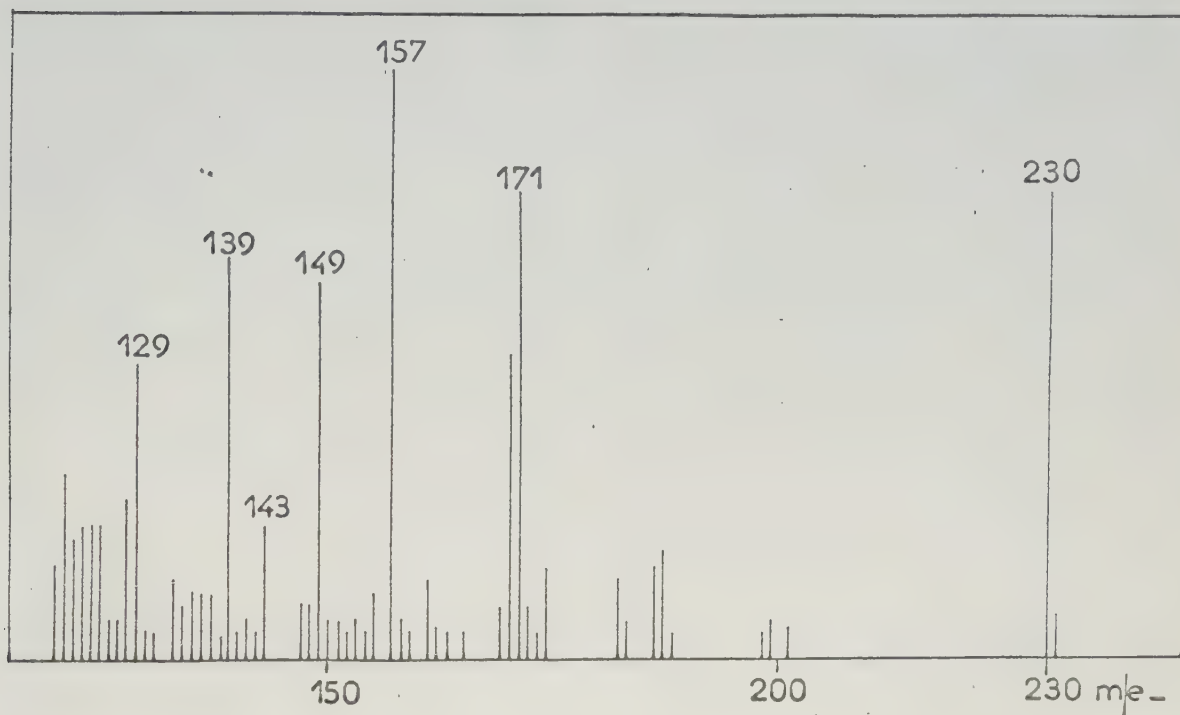


Figure 4: Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique.

L'acide amino-2 aspartyl-3 propionique (XI) est actif dans le test de flétrissement des feuilles de tomates (voir Chapitre V).

b) Acide diaspartyl-2, 3 propionique (XII).

L'analyse élémentaire est en accord avec la formule brute $C_{11}H_{16}N_2O_{10}$. Cet acide F. 185-190° ne réagit pas à la ninhydrine à 110°; il ne possède donc pas de groupement aminé primaire. Sa structure a été déterminée par la spectrométrie de masse de son ester méthylique (Figure 5 et Tableau XII).

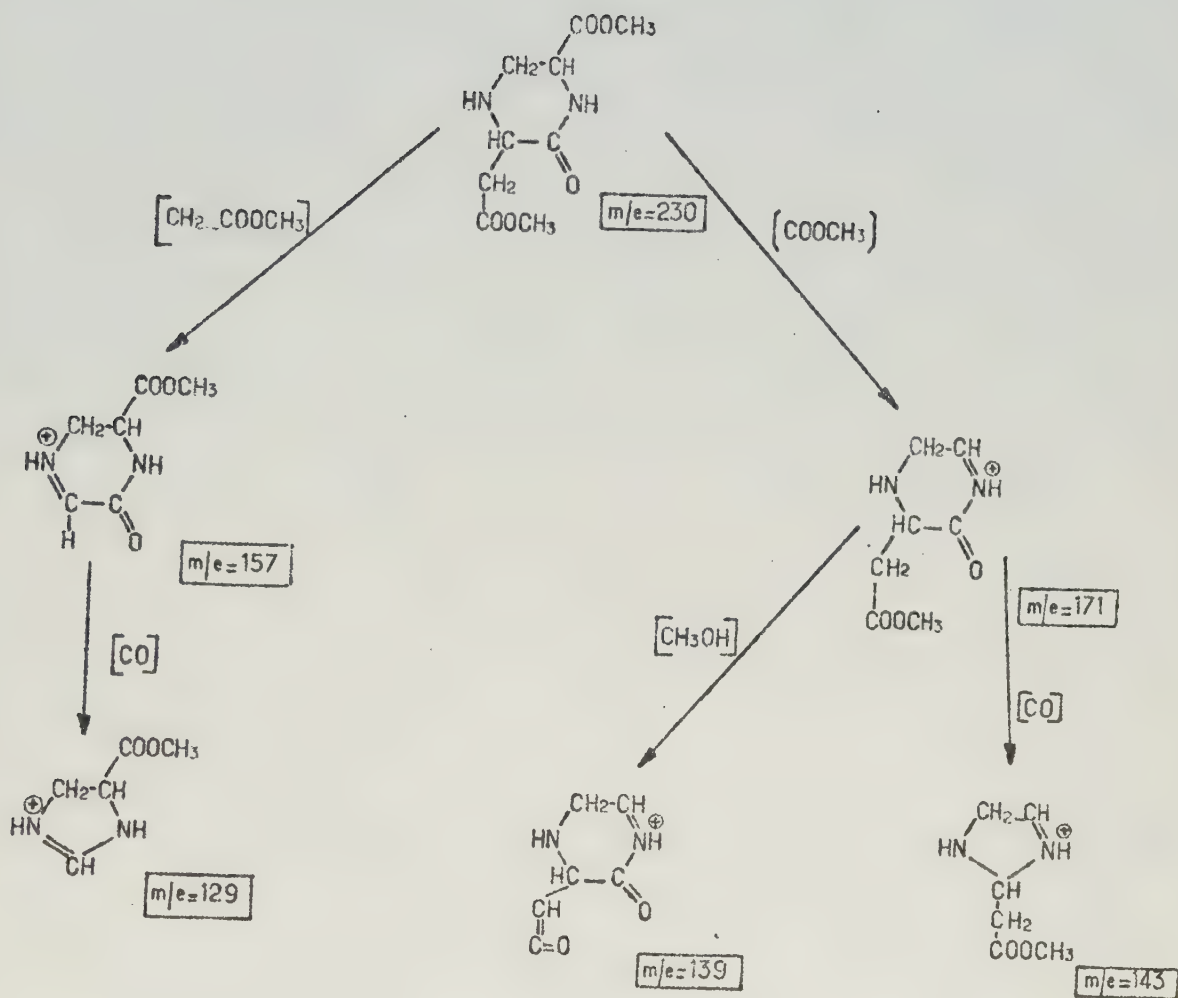


TABLEAU XI

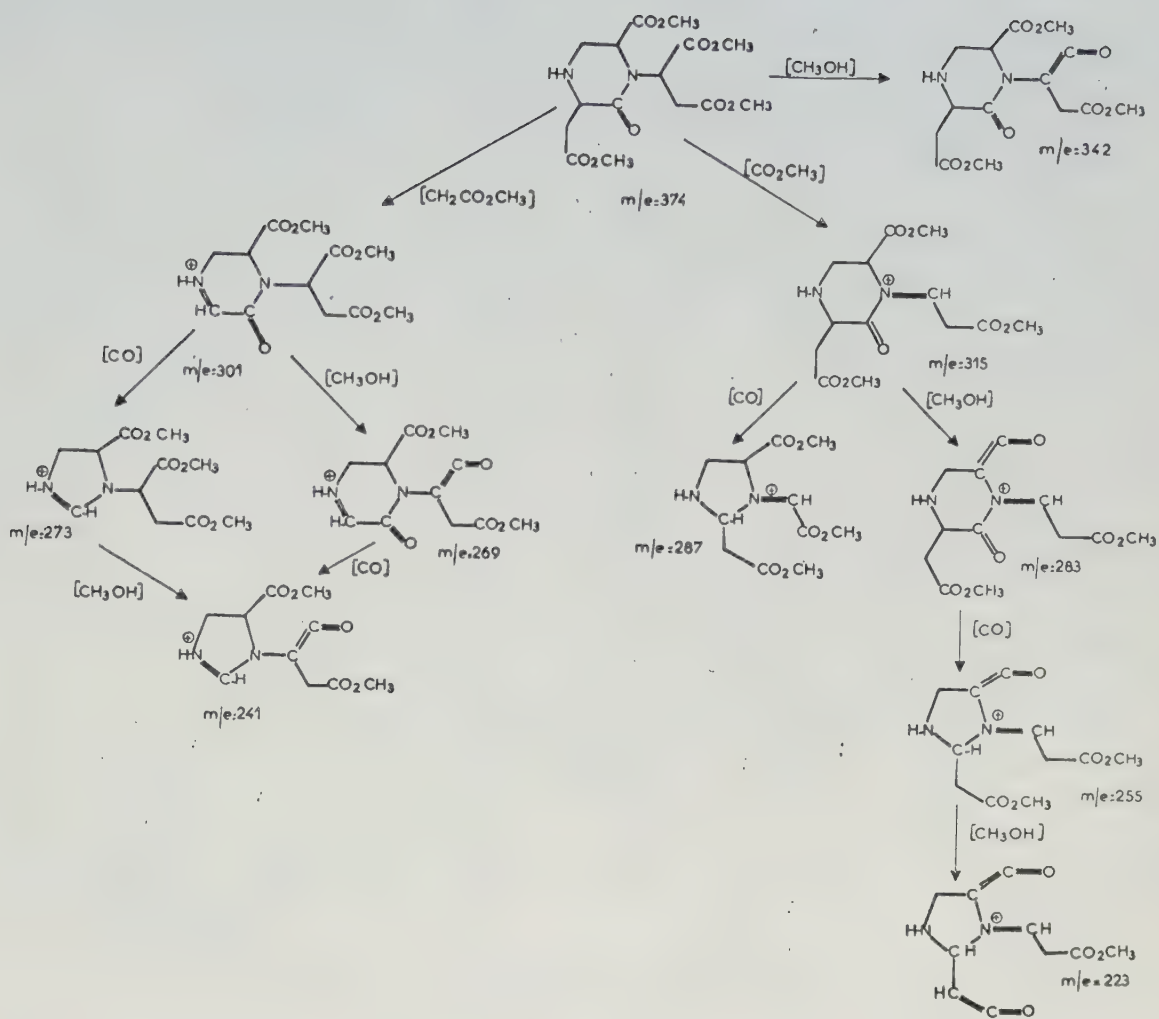


TABLEAU XII

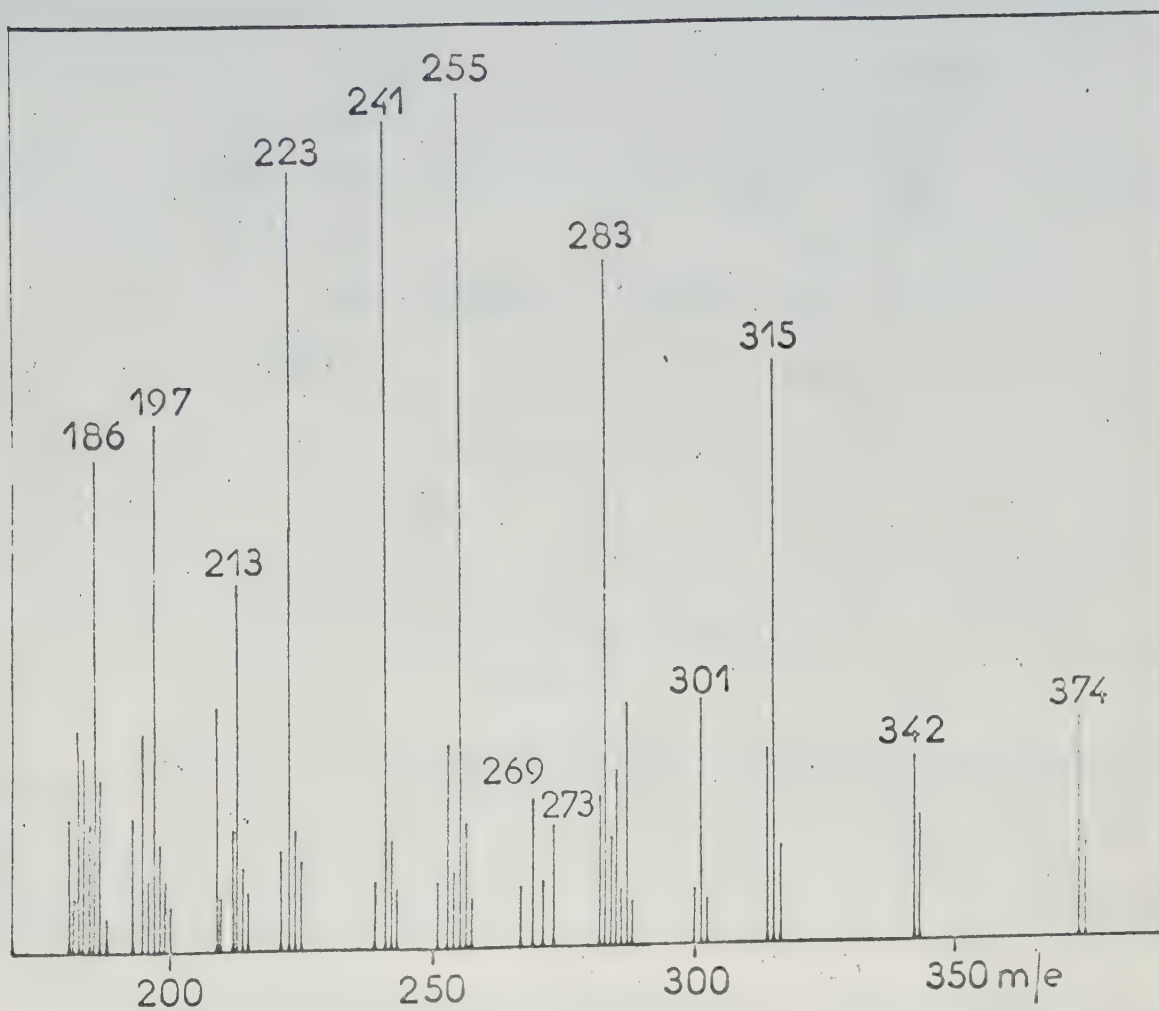
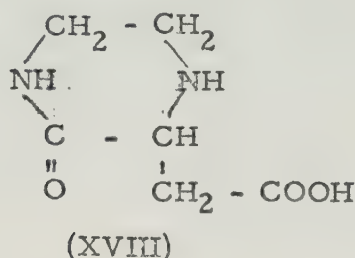
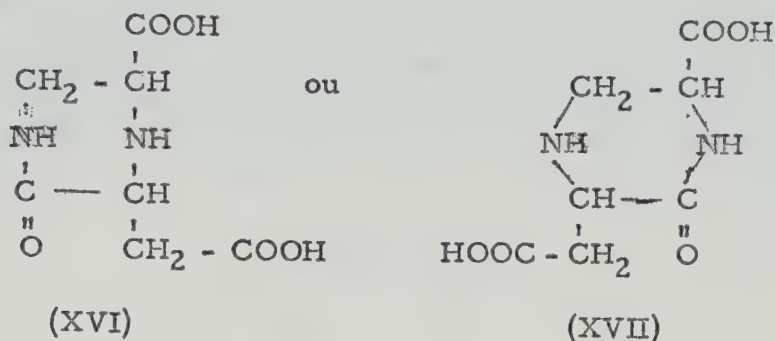


Figure 5 : Spectre de masse partiel de l'ester méthylique de l'acide diaspartyl-2, 3 propionique.

L'hydrolyse chlorhydrique de l'acide diaspartyl-2, 3 propionique fournit de l'acide aspartique, mais également une nouvelle substance (XVI) ou (XVII). La formation de ce composé est analogue à celle du composé (XVIII), observée dans les mêmes conditions à partir de l'acide éthylène-N, N' diaspartique (X).



L'étude de ces produits d'hydrolyse a été effectuée par chromatographie et électrophorèse sur papier, et par spectrométrie de masse de leurs esters éthyliques. En plus des pics fournis par le produit non hydrolysé, on observe la présence de deux pics intenses, l'un à $m/e = 258$ correspondant à l'ester éthylique du composé (XVI) ou (XVII) et un autre pic à $m/e = 185$ provenant de la perte de COOC_2H_5 à partir de $m/e = 258$.

L'acide amino-2 aspartyl-3 propionique et l'acide diaspartyl-2, 3 propionique sont actifs dans le test de flétrissement des feuilles de tomates. Ceci est un argument de plus en faveur de la forme ouverte de ces substances les lactames cycliques ayant toujours été trouvées inactives dans cette série.

L'obtention de l'acide diaspartyl-2, 3 propionique constitue une nouvelle tentative d'approche des structures des aspergillomarasmynes.

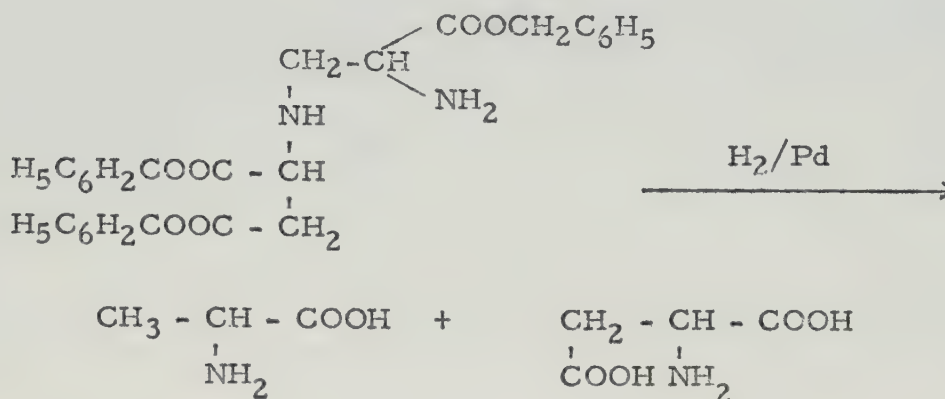
3- Observations sur une réaction d'hydrogénolyse.

En vue d'améliorer les rendements, un essai de condensation du monomaléate de benzyle sur le diamino-2, 3 propionate de benzyle a été effectué. Après hydrogénolyse il n'a pas été possible d'obtenir l'acide aspartyl-2, 3 propionique. Un mécanisme de β -hydrogénolyse facilité par la

présence de l'ester benzylique sur le carboxyle central, a été envisagé. En effet, l'étude des produits de cette réaction montre la présence d'acide aspartique et d' α -alanine.

Pour vérifier cette hypothèse de β -hydrogénolyse deux essais ont été réalisés:

- 1) L'acide amino-2 aspartyl-3 propionique a été estérifié par l'alcool benzylique en présence d'acide p-toluène sulfonique, et le triester benzylique ainsi obtenu a été soumis à une hydrogénolyse. On observe la présence d'acide aspartique et d' α -alanine.



Cette réaction apporte de plus la preuve de l'addition du monomaléate de benzyle sur le groupe aminé β par rapport au carboxyle de l'acide diamino-2, 3 propionique.

- 2) La réaction de β -hydrogénolyse a été faite de nouveau sur le diamino-2, 3 propionate de benzyle; mais dans ce cas l'acide diamino-2, 3 propionique a été retrouvé inchangé.

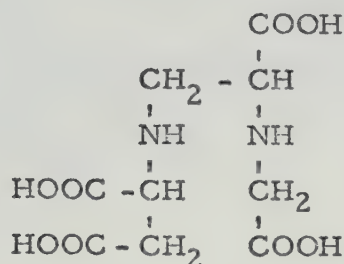
Il semble donc que la substitution du NH_2 en β du carboxyle joue un rôle dans ce mécanisme. Des expériences de β -hydrogénolyse de certaines bases de Schiff sont décrites dans la littérature (47).

La répétition de cette réaction de β -hydrogénolyse a été faite sur l'aspergillomarasmine A par Barbier et coll. (23) et a permis d'apporter une preuve supplémentaire de la structure de cette marasmine.

CHAPITRE IV

Synthèse de l'aspergillomarasmine B racémique.

(acide lycomarasmique)

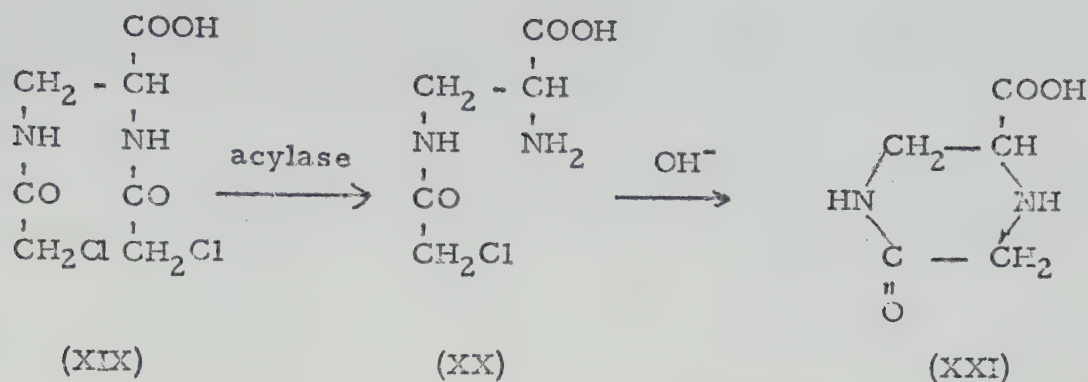


Les synthèses précédemment décrites nous ont permis de mettre au point les techniques de condensation du monomaléate de benzyle d'une part, et d'autre part d'étudier les propriétés chimiques, spectrographiques et biologiques des divers analogues obtenus. En particulier, les fragmentations observées en spectrométrie de masse qui aboutissent à des ions de structure comparable pour ces différents analogues, démontrent la validité du schéma de dégradation par spectrométrie de masse tel qu'il avait été proposé par Biemann et Vetter (21).

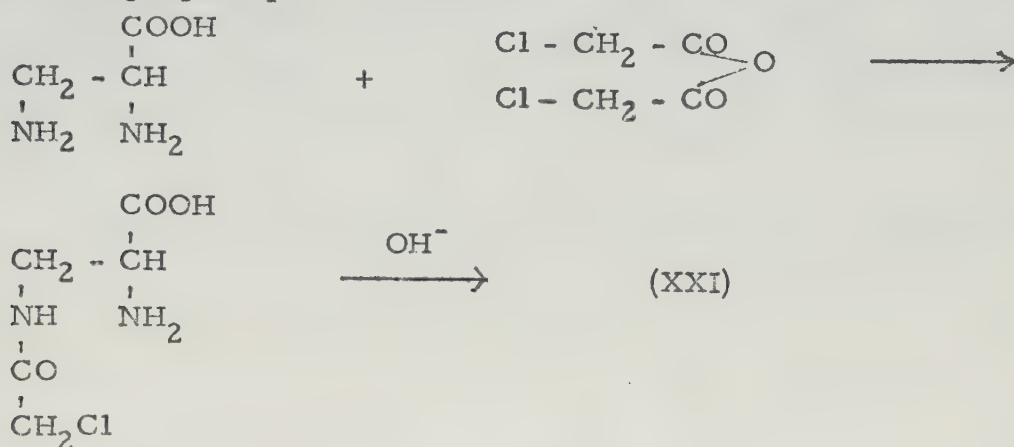
Nous décrirons maintenant la synthèse qui nous a permis d'obtenir l'aspergillomarasmine B racémique (acide lycomarasmique) ainsi que l'identification du composé obtenu avec l'aspergillomarasmine B authentique précédemment isolée d'Aspergillus flavus orizae.

1 - Synthèse.

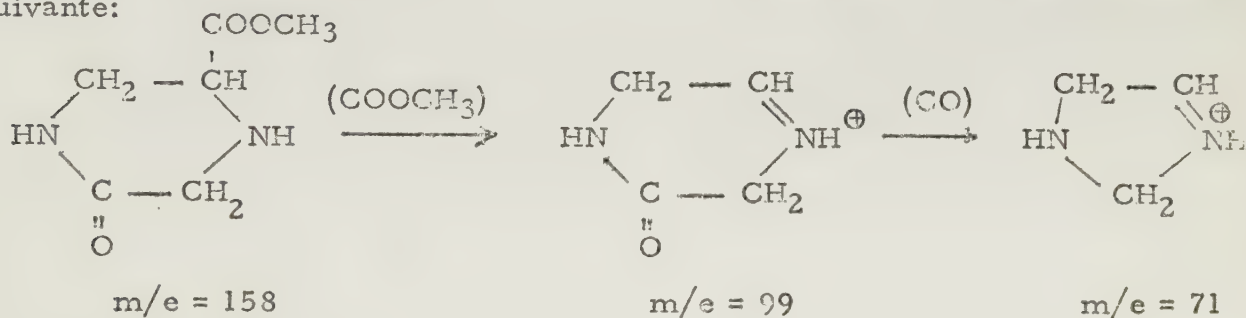
Greenstein et coll. (48) ont effectué la synthèse de l'acide α -carboxyméthylamino- β aminopropionique (XXII) à partir du β -chloroacétate de l'acide diamino-2, 3 propionique (XX). Dans cette synthèse, le β -chloroacétate de l'acide diamino-2, 3 propionique était préparé par action de l'acylase sur l' α, β dichloroacétate de l'acide diamino-2, 3 propionique. Par action prolongée d'une base, le β -chloroacétate se cyclise avec élimination d'acide chlorhydrique, en acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 (XXI).



Nous avons préparé le monochloroacétate de l'acide diamino-2, 3 propionique par action de l'anhydride monochloroacétique sur l'acide diamino-2, 3 propionique.



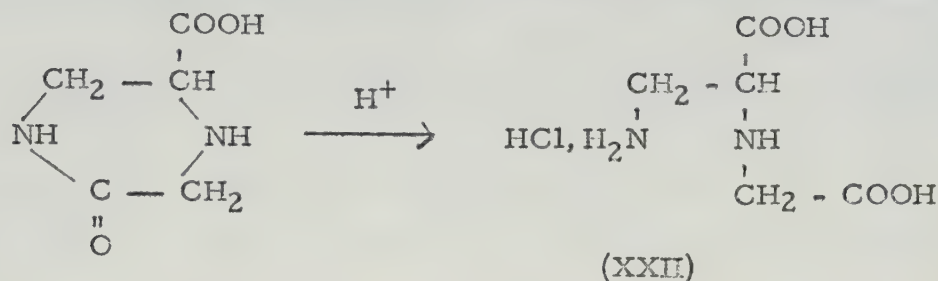
Nous avons confirmé la structure de l'acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 (XXI) par la spectrométrie de masse de son ester méthylique. En plus du pic attendu à $m/e = 158$ pour l'ion moléculaire, on observe la présence de pics intenses à $m/e = 99$ et 71 correspondant à la fragmentation suivante:



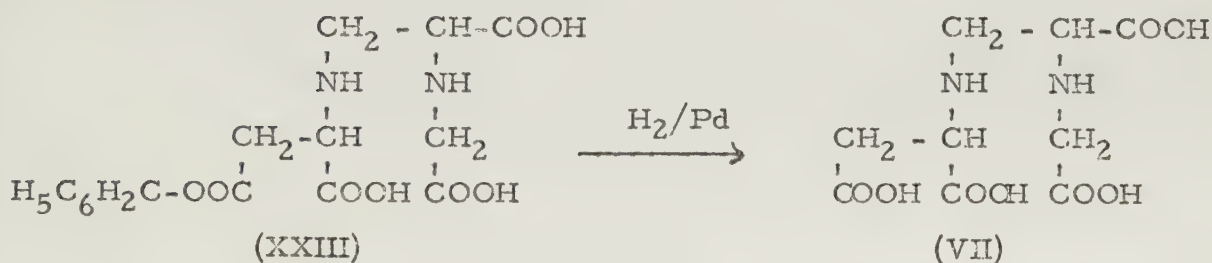
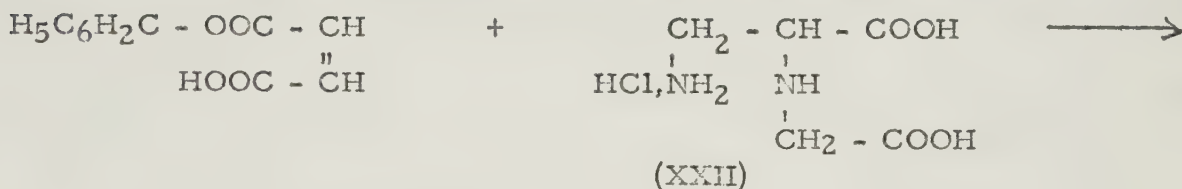
La formation de ces ions procède du même mécanisme de fragmentation que celui précédemment observé pour les esters des aspergillomarasmines et de leurs analogues synthétiques (23, 30 et 31).

Cet acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 se présente sous la forme d'une poudre incolore F. 154-156°. Il donne une seule tache en électrophorèse, facile à identifier grâce à sa coloration orange à la ninhydrine.

Cette amide est hydrolysée en milieu chlorhydrique pour fournir le chlorhydrate de l'acide α -carboxyméthylamino- β aminopropionique (XXII). Cet aminoacide constitue une partie de la structure de l'aspergillomarasmine B.



Le monomaléate de benzyle a été condensé sur l'acide α -carboxyméthylamino β -aminopropionique (XXII). Après hydrogénéolyse on obtient un extrait contenant de l'aspergillomarasmine B racémique. Le produit a été purifié par chromatographies et électrophorèses préparatives. Après cristallisation dans le mélange acétone-eau à pH 2,5, il fond à 225-235°.



Le rendement total de la synthèse de l'aspergillomarasmine B est de 0,07 % par rapport à l'acide diamino-2, 3 propionique et de 14 % par rapport à l'acide céto-2 pipérazine carboxylique-5.

2 - Structure.

La substance obtenue fond à 215° (ramollissement) 225-235° (décomposition).

Le produit synthétisé est homogène et son identité avec le composé naturel a été prouvée par diverses méthodes chromatographiques, par spectrométrie de masse et par étude des produits d'hydrolyse.

L'analyse élémentaire est en accord avec les résultats attendus pour la formule brute $C_9H_{14}N_2O_8$.

L'ester éthylique présente un spectre de masse comparable à celui de l'anhydro-aspergillomarasmine B naturelle.

- On observe l'ion moléculaire attendu à $m/e = 344$
- La présence d'une paire de pics à $m/e = 298$ et 299 correspond à la perte de C_2H_5OH et de C_2H_5O .
- Le pic intense à $m/e = 271$ représente la perte d'un des deux groupements $-CO_2-C_2H_5$ fixés sur un atome de carbone portant un atome d'azote et correspondant au "pic d'amine", généralement intense pour des dérivés d'acides aminés.
- Le pic à $m/e = 270$ (M-74) est dû: soit à la perte d'un groupe $-CO_2C_2H_5$ (avec un hydrogène supplémentaire provenant de l'ion moléculaire) soit à la perte de CO à partir du fragment $m/e = 298$.
- Le pic à $m/e = 257$ résulte de la perte de $-CH_2CO_2C_2H_5$ à partir de l'ion moléculaire, correspondant au "pic d'ester" de l'acide aspartique.
- Deux séries parallèles de pics dérivent des fragments à $m/e = 271$ et 257 , par perte de CO et de C_2H_5OH ,
 - à partir de $m/e = 271$ on a perte de CO donnant le pic à $m/e = 243$ puis élimination de C_2H_5OH (pic métastable 187, calculé 186, 8) donnant le pic à $m/e = 225$, et enfin le pic à $m/e = 197$ provenant de la perte de CO et de C_2H_5OH .
 - à partir de $m/e = 257$, les pics à $m/e = 229$, 211 et 183 peuvent être expliqués de la même manière.
- Les pics à $m/e = 169$ et 155 proviennent probablement de la perte de 2 CO et C_2H_5OH à partir des pics à $m/e = 271$ et 257 .
- Les pics situés dans la région inférieure du spectre sont plus difficiles à expliquer sans haute résolution ou marquage isotopique.

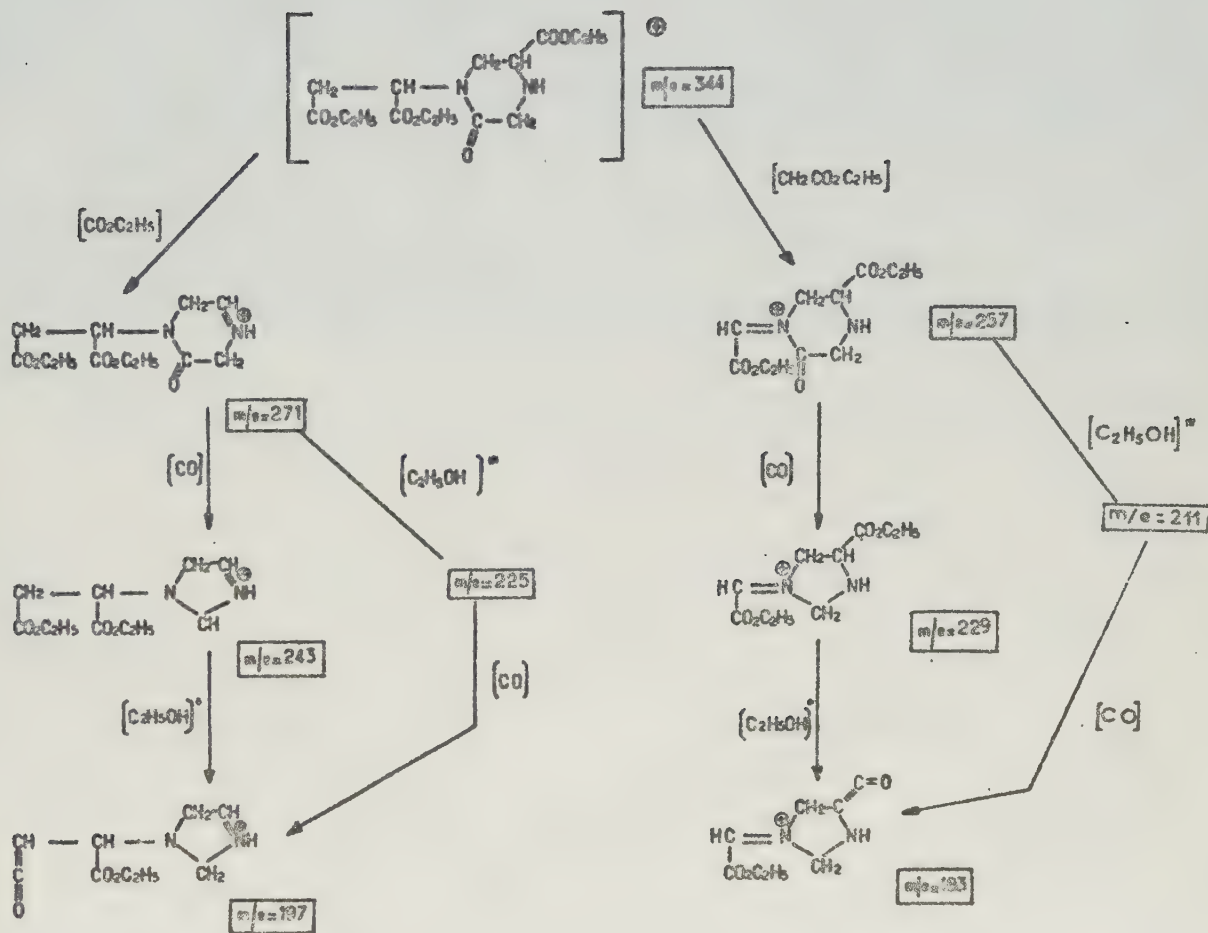


TABLEAU XIII

* Une seule des deux possibilités de perte de ce groupe est représentée.

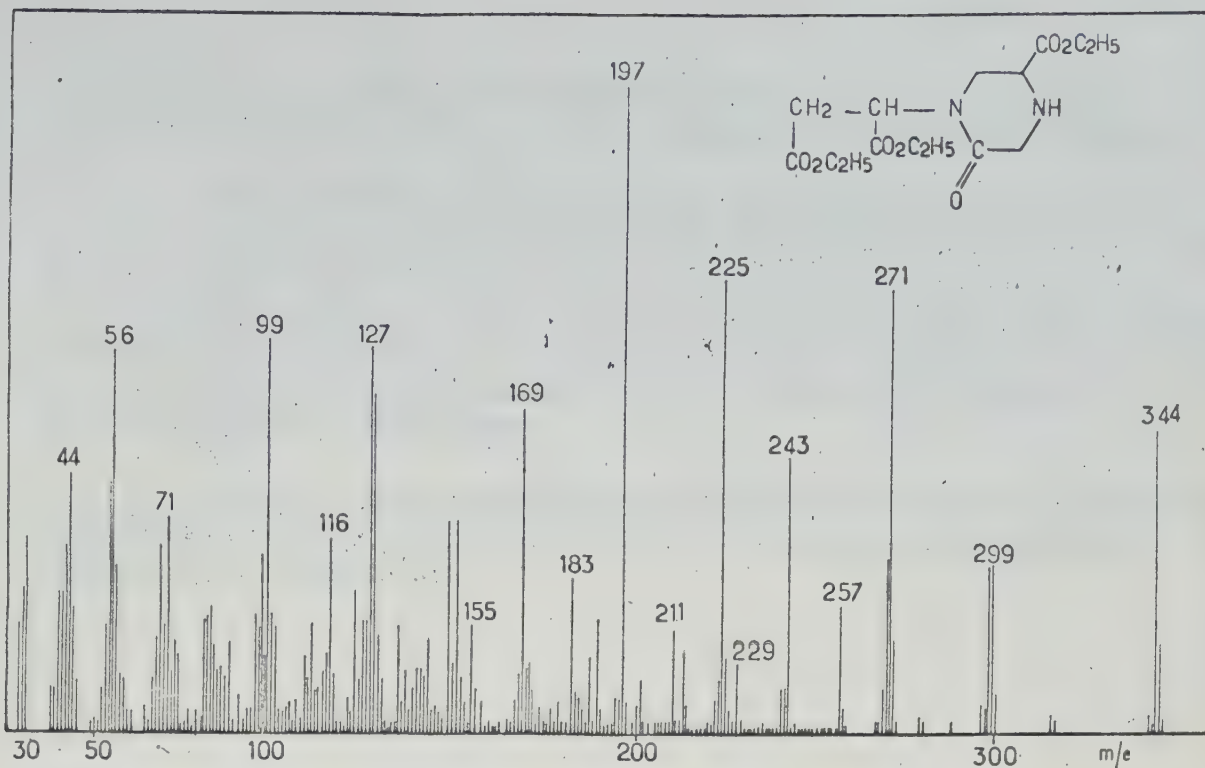


Figure 6: Spectre de masse de l'ester éthylique de l'aspergillomarasmin B naturelle.

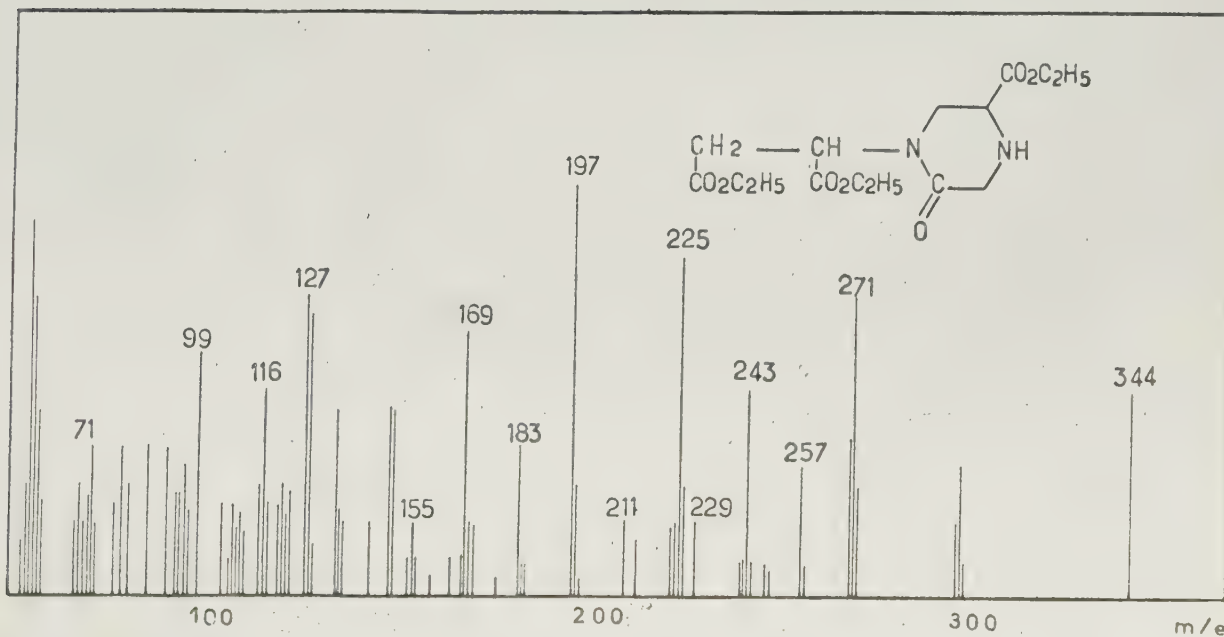


Figure 7: Spectre de masse de l'ester éthylique de l'aspergillomarasmin B de synthèse.

- La perte de CO = 28 a été contrôlée à l'aide du spectre de l'ester méthylique où l'on retrouve bien la différence de 28 et non 14 (CH₂).

Une hydrolyse chlorhydrique a été effectuée sur la substance synthétisée. Les chromatographies et électrophorèses montrent la présence de trois substances révélables par la ninhydrine. Leurs déplacements correspondent respectivement à ceux d'échantillons authentiques d'anhydro-aspergillomarasmine B, de glyocolle et d'acide aspartique. Ces résultats sont les mêmes que ceux observés lors de l'hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine B authentique.

Enfin l'aspergillomarasmine B de synthèse produit, à la même concentration que le produit naturel, le flétrissement des feuilles de tomates (voir Chapitre V).

CHAPITRE V

Activités biologiques des produits synthétisés.

Robert et coll. (21, 24) ont défini les conditions des essais biologiques permettant de déterminer l'activité flétrissante des aspergillomarasmines sur les feuilles de tomates. Cette activité se trouve renforcée par la présence des ions ferriques.

Divers composés synthétiques industriels, ont également été étudiés du point de vue de leur activité flétrissante.

Nous donnons dans le Tableau XIV la structure de ces agents complexants industriels, et dans le Tableau XV les activités biologiques de ces substances.

Certains composés industriels synthétiques sont très actifs, en particulier l'acide nitrilotriacétique N. T. A.

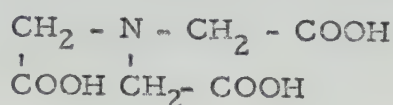
Nous avons pu vérifier avec les aspergillomarasmines naturelles la remarque de Robert (24) suivant laquelle l'aspergillomarasmine B était la plus active. L'aspergillomarasmine B de synthèse est aussi active que le composé naturel. D'après nos résultats la présence de composé racémique dans les produits de synthèse ne semble pas avoir une influence sur l'activité biologique. Cependant, une comparaison plus précise des activités du produit naturel et du produit synthétique devrait reposer sur une détermination préalable de l'activité limite; elle devrait en outre tenir compte des différents pourcentages d'isomères présents dans le produit de synthèse.

Nous reportons dans le Tableau XVI l'activité biologique des aspergillomarasmines.

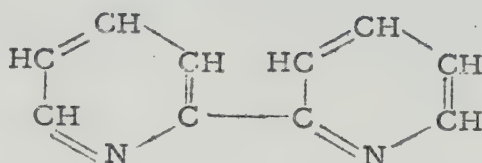
Les solutions d'agents complexants industriels, et celles des aspergillomarasmines et des produits de synthèses ont été faites à l'aide de l'eau du robinet, le pH étant ajusté à 7 quand cela était nécessaire. Dans tous les cas les essais ont été effectués en présence de chlorure ferrique (3 mg/100 ml).

TABLEAU XIV

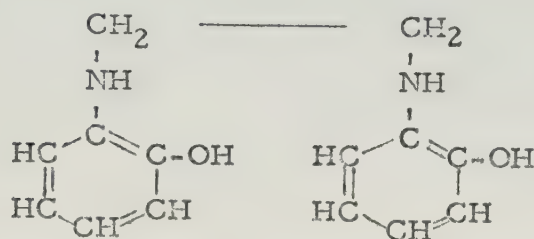
(VII) Acide nitrilotriacétique : N. T. A.



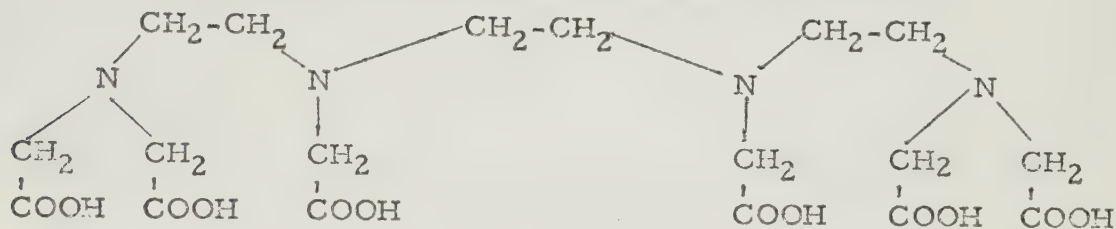
(XXIV) α, α' -dipyridyl



(XXV) éthylène diamine N, N'-bis (o-hydroxyphényl)



(XXVI) Acide triéthylène tétramine hexaacétique T. T. H. A.



(VIII) Acide éthylène diamine tétraacétique E. D. T. A.

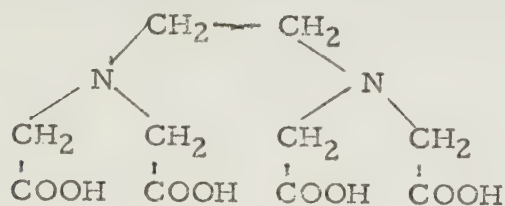
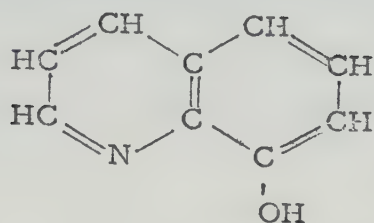


TABLEAU XIV (suite)

(XXVII) 8-hydroxyquinoléine



(XXVIII) Acide trans 1,2-diamino-cyclohexyl N, N'-tétracétique

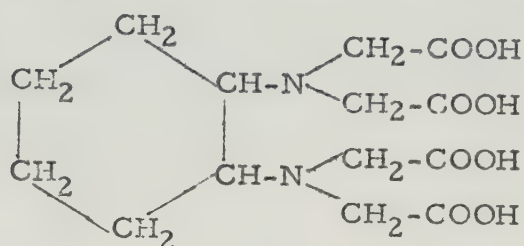


TABLEAU XV

Activités biologiques des agents complexants industriels.

	Substances	Doses mg/ml	24 h.	48 h.	72 h.
(VII)	Acide nitriloacétique N. T. A.	0,2	+	++	+++
(XXIV)	α, α' -dipyridyl	0,2	+	++	+++
(XXV)	Ethylène diamine N, N' bis (o-hydroxyphénylacétique)	0,2	+	++	+++
(XXVI)	Acide triéthylène tétramine hexaacétique T. T. H. A.	0,2	++	+++	++++
(VIII)	Acide éthylène diamine tétraacétique E. D. T. A.	0,2	-	-	-
(XXVII)	8-hydroxyquinoléine	0,2	-	-	-
(XXVIII)	Acide trans-1, 2 diamino- cyclohexyl N, N'- tétraacétique	0,2	-	-	-

- pas d'activité
 + début de flétrissement
 ++ flétrissement en cours
 +++ flétrissement complet
 ++++ feuilles mortes et sèches

TABEAU XVI

Activité biologique des aspergillomarasmines et des
substances de synthèse.

Substances	Doses mg/ml	24 h.	48 h.	72 h.
(IV) lycomarasmine	0,2	++	+++	++++
(X) acide éthylène N, N'-diaspartique	0,2	+	++	+++
(XI) acide amino-2 aspartyl-3 propionique	0,5	+	++	+++
(XII) acide diaspartyl-2, 3 propionique	0,4	++	+++	++++
(VII) aspergillomarasmine B naturelle	0,2	++	+++	++++
(VII) bis aspergillomarasmine B de synthèse	0,2	++	+++	++++

La photographie ci-dessous illustre les résultats figurant dans le Tableau XVI.

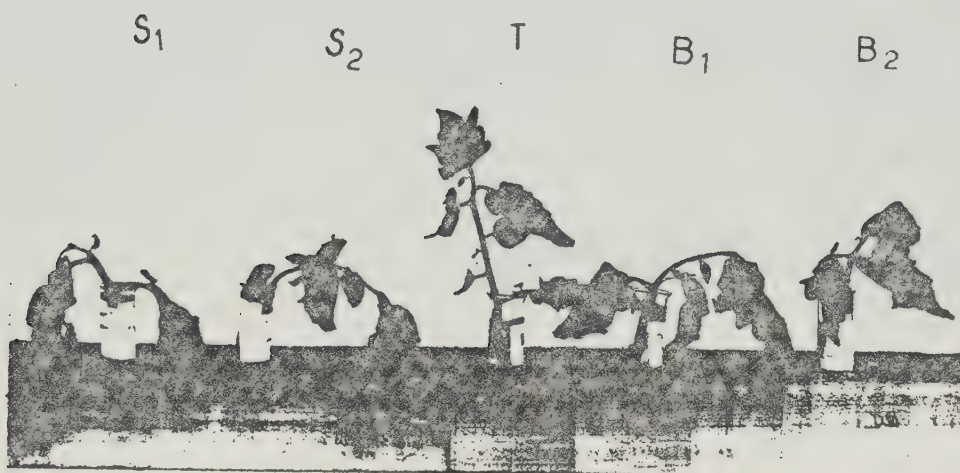


Figure 8

Effet des aspergillomarasmines naturelles et de synthèse sur les feuilles de tomates:

- S₁ Acide éthylène-N, N'-diaspartique
- S₂ Acide amino-2 aspartyl-3 propionique
- T Témoin
- B₁ Aspergillomarasmine B de synthèse
- B₂ Aspergillomarasmine B naturelle.

II - PARTIE EXPERIMENTALE

SYSTEMES DE CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE.

a) Chromatographies sur papier:

Elles ont été effectuées sur papier Whatman n°1

Solvants utilisés :

- N°1 pyridine-eau (97,5 : 52,5)
- N°2 butanol-acide acétique-eau (150 : 20 : 15)
- N°3 butanol tertiaire -acide formique-eau (69,5:1:29,5)
- N°4 pyridine-acide acétique-eau (10 : 7 : 3)
- N°5 phénol-eau (en présence de KCN) (8 : 2)
- N°6 méthanol-eau-pyridine-HCl conc. (32 : 7 : 4 : 1)

b) Electrophorèses sur papier:

Elles ont été effectuées sur papier Whatman 3 MN pendant 4 heures à 300 volts et 50 mA (2 volts par cm).

Solvant utilisé:

tampon: pyridine-acide acétique-eau (100:4:900) pH: 6,4

CHAPITRE I

1- Ester benzylique de l'acide N-butylaspartique.

5,6 g d'anhydride maléique (soit 0,1 mole) dans 25 ml d'alcool benzylique, sont portés deux heures à 100°. On évapore ensuite l'alcool benzylique en excès. Le résidu est refroidi à 0° et additionné à 10 ml de triéthylamine, lentement et en rendant la solution homogène par addition de méthanol absolu. On ajoute en une seule fois, à la solution homogène, 0,05 mole de N-butylamine (soit 3,65 g) et on porte une heure à 80°. Après refroidissement, le produit de la réaction est essoré sur Büchner et on obtient 10,6 gd'ester de l'acide N-butylaspartique.

Les différents essais de cristallisation de cet ester n'ont pas réussi, et nous avons utilisé ce produit sous forme amorphe, pour effectuer l'hydrogénolyse.

2- Acide N-butylaspartique.

300 mg d'ester monobenzylique sont dissous dans 10 ml de méthanol absolu, et on ajoute une suspension de 300 mg de palladium sur charbon (5 %) dans le méthanol. Cette manipulation doit être entièrement conduite sous un courant d'azote, afin d'éviter l'inflammation du méthanol en présence de catalyseur. Cette suspension est agitée à la température ambiante pendant 12 heures, en atmosphère d'hydrogène. Le catalyseur est séparé par centrifugation, lavé trois fois au méthanol, puis trois fois à l'eau. Les solutions méthanoliques et aqueuses, sont concentrées sous vide, et on obtient après cristallisation dans le mélange eau-acétone 155 mg de cristaux F. 160-162°.

Analyse $C_8H_{15}NO_4$	Calc. %	C	50,78	H	7,99	N	7,40
	Tr.		50,91		8,12		7,33

Hydrolyse chlorhydrique:

8 mg d'acide N-butylaspartique ont été hydrolysés en tube scellé pendant 14 heures en présence de 1 ml d'HCl 6 N, à 110°. Après avoir amené à sec sous vide poussé, on étudie les produits d'hydrolyse par électrophorèse (tampon pH = 6,4) et par chromatographie sur papier (Systèmes n°2 et 6) et on constate l'absence d'acide aspartique (système n°2 : absence de front 1 cm ; système n°6 : Rf 0,49).

CHAPITRE II

1- Ester dibenzylique de l'acide éthylène-N,N'-diaspartique (XIV).

11,2 g d'anhydride maléique sont dissous dans 40 ml d'alcool benzylique, et on chauffe deux heures à 100°, au bain d'huile. L'alcool benzylique en excès est évaporé à 150° sous 20 mm. Le résidu est refroidi à 0°, et en agitant il est dissous lentement dans 20 ml de triéthylamine, en alternant avec quelques gouttes de méthanol absolu, pour faciliter la dissolution. Puis à la solution homogène on ajoute 1,5 g d'éthylène diamine et l'on chauffe une heure à 80-90° (température du bain d'huile). Le produit de cette réaction est repris dans 15 ml d'acétone, et précipité par addition d'éther anhydre; on attend deux heures et on sépare par décantation l'huile jaune clair qui s'est formée. Cette huile est reprise par l'isopropanol à chaud; à froid le produit cristalline, incolore. Il est séparé par filtration et lavé à l'éther anhydre. On obtient ainsi 3,65 g.

Une recristallisation dans l'isopropanol permet d'obtenir un produit dont le point de fusion est F 70-75°, soluble dans l'acétone, le chloroforme, le méthanol et l'isopropanol à chaud; insoluble dans l'éther et dans l'eau; et donnant à 60° une réaction négative à la ninhydrine. Ce produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt (150 g d'acide silicique pour 3 g d'ester). Il a été élué par un mélange de chloroforme contenant des proportions croissantes de méthanol absolu. Le produit purifié est élué par le mélange chloroforme-méthanol 9:1. Le produit obtenu est recristallisé comme précédemment dans l'isopropanol à chaud.

On obtient ainsi 2,28 g d'ester benzylique de l'acide éthylène-N,N'-diaspartique . F 86-88°

Analyse élémentaire:

calc. %	pour $C_{24}H_{28}N_2O_8$	C 61,01	H 5,97	N 5,93
calc. %	pour la lactame $C_{24}H_{26}N_2O_7$	C 63,42	H 5,77	N 6,16
trouvé %		61,04	5,55	5,32
		60,78	5,69	

2 - Acide éthylène-N, N'-diaspartique (X).

1 g d'ester dibenzyle de l'acide éthylène-N, N'-diaspartique (XIV) est dissous dans 15 ml d'alcool absolu. A cette solution on ajoute une suspension de 1 g de palladium sur charbon (5 %) dans 5 ml de méthanol absolu en prenant les précautions décrites pour l'acide N-butylaspartique. Après 12 heures, le catalyseur est séparé par centrifugation, lavé au méthanol et à l'eau. Les solutions méthanoliques sont concentrées sous vide. Après un séjour de 12 heures à -10° , on obtient 122 mg de cristaux incolores F 123-132°. Les eaux mères réunies, fournissent encore 312 mg et l'eau de lavage du catalyseur 93 mg.

Le produit obtenu est insoluble dans l'acétone, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone; il est soluble dans l'eau et dans le méthanol.

Analyse élémentaire:

calc. % pour $C_{10}H_{16}N_2O_8$	O 41,10	H 5,52	N 9,59
calc. % pour la lactame $C_{10}H_{14}N_2O_7$	C 43,80	H 5,15	N 10,22
trouvé %	41,65	6,10	9,50

Spectre ultraviolet :

1 mg d'acide éthylène-N, N'-diaspartique, estérifié par le diazométhane, et dissous dans 3,5 ml de cyclohexane, montre un maximum d'absorption
max = 204 m μ ($\epsilon = 4000$).

Etude des produits d'hydrolyse de l'acide éthylène-N-N'-diaspartique:

10 mg d'acide éthylène-N, N'-diaspartique ont été hydrolysés durant 16 heures à 110° , par 3 ml d'acide chlorhydrique 6 N. La solution est ensuite amenée à sec sous vide poussé.

La chromatographie sur papier dans le système n°5 (ascendante et absence de front) montre la présence d'une substance réagissant difficilement à la ninhydrine et de parcours 9,5 cm. Dans ces mêmes conditions les témoins acide aspartique et alanine ont respectivement des parcours de 5,5 cm et 33 cm.

L'électrophorèse (pH = 6,4) montre la présence d'une substance neutre restant au point de départ, et l'absence d'acide aspartique (+ 7 cm).

CHAPITRE III

1 - Préparation du monomaléate de benzyle cristallisé.

7,9 g de potassium sont dissous à 0° dans 200 ml d'alcool benzylique. A cette solution on ajoute à froid et en agitant, une solution de 19,6 g d'anhydride maléique dans 200 ml d'alcool benzylique. Le sel de potassium est ensuite précipité par addition de deux litres d'éther. Le précipité est filtré, lavé à l'éther, séché. Ce précipité est ensuite dissous dans 70 ml d'eau; et la solution obtenue est acidifiée par HCl et extraite par 300 ml d'éther. La fraction étherée, amenée à sec sous vide, est cristallisée dans le mélange éther/éther de pétrole.

On obtient 33 g de monomaléate de benzyle F 53-54°.

2 - Préparation de l'acide diamino-2,3 propionique.

a) Acide dibromo-2,3 propionique:

A 50 g de 2-3 dibromopropanol refroidis et agités, on ajoute goutte à goutte un mélange de 70 g d'acide nitrique concentré et 30 g d'acide nitrique fumant. On évapore ensuite l'acide nitrique sous vide, et on distille le produit sous un vide de 20 mm. Dans ces conditions l'acide dibromo-2,3 propionique passe à 145-155°. On obtient 36,8 g d'acide dibromo-2,3 propionique.

b) Acide diamino-2,3 propionique:

10 g d'acide dibromo-2,3 propionique sont chauffés en autoclave à 125° pendant 4 heures, avec 180 ml d'une solution saturée à 0° d'ammoniaque. Après refroidissement, on évapore sous vide la solution, en atmosphère d'azote. Le résidu cristallisé est repris par l'eau à ébullition et cristallisé dans l'eau.

On obtient 3,8 g d'acide diamino-2,3 propionique F 230-232°.

3- Acide amino-2 aspartyl-3 propionique.

a) Synthèse :

Ester benzylique de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique:

2 g de monomaléate de benzyle sont dissous à 0° dans 20 ml de triéthylamine; on facilite la dissolution en ajoutant goutte à goutte environ 5 ml de méthanol absolu. De cette manière on obtient une dissolution totale. On ajoute alors 1 g de bromhydrate de l'acide diamino-2, 3 propionique et la suspension ainsi obtenue est portée à reflux à 85-90°, au bain d'huile pendant 2 h. 30 avec agitation magnétique. La plus grande partie de l'acide passe en solution au bout d'une heure environ, et le produit formé se sépare en une couche huileuse distincte. On amène tout le produit à sec en tiédissant vers 60°. On élimine ensuite, tout d'abord l'acide diamino-2, 3 propionique qui n'a pas réagi; pour cela on reprend par du chloroforme (fraîchement distillé sur chlorure de calcium) et on filtre. La solution chloroformique est amenée à sec sous vide et reprise par 200 ml d'isopropanol à 35°, puis abandonnée à 0° pendant deux heures. Le bromhydrate de triéthylamine reste en majorité dans l'isopropanol, et on obtient un précipité blanc, contenant encore un peu de bromhydrate de triéthylamine. On lave trois fois par l'isopropanol froid. Toutes les séparations sont effectuées par centrifugation. Le précipité est ensuite lavé deux fois par l'éther anhydre et séché.

On obtient 365 mg d'ester.

Le point de fusion montre un ramollissement vers 110° et fusion à 120-130°. Cet ester est très soluble dans l'eau, légèrement soluble dans le méthanol et le chloroforme, et insoluble dans l'éther et l'acétone.

Acide amino-2 aspartyl-3 propionique:

On effectue une hydrogénéolyse sur 300 mg d'ester avec 300 mg de catalyseur (palladium sur charbon à 5 %) comme décrit précédemment (Chapitre I). On facilite la dissolution dans le méthanol par adjonction de quelques gouttes d'eau. Le produit obtenu après lavages du catalyseur par le méthanol est filtré sur filtre millipore recouvert d'environ 1 cm de célite pour éliminer les traces de palladium (cette manipulation est toujours nécessaire en présence d'eau dans la réaction). Le filtrat est amené à sec. On obtient 125 mg de produit.

La cristallisation est effectuée dans le minimum d'eau et de méthanol et on obtient: 40 mg de cristaux incolores, F 160-180°. Après trois cristallisations le point de fusion est de 180-190° (ramollissement à 160°).

b) Structure :

Cet acide réagit à la ninhydrine en donnant une coloration mauve. Après traitement de la feuille de chromatographie par une solution diluée de sulfate de cuivre, séchage, et aspersion d'une solution de ninhydrine la coloration n'apparaît plus. Dans ces mêmes conditions un témoin β -aminé donne toujours une coloration avec la ninhydrine. Cette réaction au sulfate de cuivre est spécifique des groupes α -aminés primaires. Cet acide est soluble dans l'eau, peu soluble dans le méthanol et le chloroforme et insoluble dans l'éther et l'acétone.

Hydrolyse acide :

10 mg de substance ont été hydrolysés en tube scellé, 10 heures avec HCl 5 N, à 110°.

Par chromatographie sur papier on constate la présence d'acide aspartique:

Système n°1 : produit d'hydrolyse	17,5 cm
acide aspartique	17,5 cm
α -alanine	20,5 cm

Système n°2 : produit d'hydrolyse	2 cm
acide aspartique	2 cm
α -alanine	10 cm
sérine et glycocolle	3,5 cm

Par électrophorèse sur papier (pH = 6,4) on obtient le même résultat:

produit d'hydrolyse	+ 8 cm
acide aspartique	+ 8 cm
α -alanine	- 1 cm

Désamination nitreuse et hydrolyse acide:

1 mg de substance est dissous dans 0,05 ml d'acide chlorhydrique N et additionné de 2 mg de NaNO_2 . Après 15 minutes on ajoute 5 mg de phénylalanine et 1 ml d'HCl 5 N. Après 30 minutes, le tube est scellé et maintenu 10 heures à 110°.

Après avoir amené à sec on constate les mêmes résultats que précédemment par chromatographies et électrophorèse sur papier.

Isolement de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique par électrophorèse:

Dans les mêmes conditions que précédemment on observe en électrophorèse deux taches à +2 cm et + 5 cm. Ces deux taches ont été isolées par électrophorèse préparative.

4- Acide diaspartyl-2, 3 propionique:

a) Synthèse :

Ester benzylique de l'acide diaspartyl-2, 3 propionique:

6 g de monomaléate de benzyle sont dissous dans 30 ml de triéthylamine à 0° et en facilitant la dissolution à l'aide de 5 à 6 ml de méthanol absolu. On ajoute en une seule fois un gramme de bromhydrate d'acide diamino-2, 3 propionique. On porte 2 h. 30 à 85° au reflux avec agitation magnétique, au bain d'huile. Après 15 minutes, tout l'acide diamino-2, 3 propionique est passé en solution et celle-ci est parfaitement homogène. On amène à sec sous vide. Le bromhydrate de triéthylamine est éliminé comme précédemment en reprenant plusieurs fois par l'isopropanol à froid, et en séparant par centrifugation le produit insoluble (qui se présente sous forme d'huile).

Cette huile est reprise plusieurs fois par le minimum d'acétone et précipitée par l'éther anhydre. On lave enfin par l'éther anhydre. On obtient 1365 mg d'un produit jaune et huileux.

Ce produit est très soluble dans l'eau, le méthanol et l'acétone, peu soluble dans l'isopropanol à froid et insoluble dans l'éther et le chloroforme.

Il ne présente pas de réaction à la ninhydrine à 60°.

Acide diaspartyl-2, 3 propionique:

L'hydrogénolyse a été faite sur 1,2 g d'ester en présence de 1,2 g de palladium sur charbon dans le méthanol. On sépare le catalyseur par centrifugation. Le catalyseur est lavé plusieurs fois par le méthanol, puis une fois à l'eau. Les solutions méthanoliques et aqueuses sont débarrassées des traces de catalyseur par passage sur filtre millipore recouvert de célite.

On obtient 140 mg de produit dans la phase aqueuse et 555 mg de produit dans la phase méthanolique. On recristallise séparément ces fractions.

Le produit soluble dans le méthanol est précipité de cette solution par adjonction d'éther anhydre à 0°, puis cristallisé dans le mélange méthanol-isopropanol. On obtient 180 mg de cristaux F. 110-120°. Ce produit ne

donne pas de réaction colorée avec la ninhydrine à 100°. Aucun spectre de masse n'a pu être obtenu après estérification par le méthanol chlorhydrique. La chromatographie et l'électrophorèse sur papier, effectuées après hydrolyse chlorhydrique, fournissent au moins 4 taches révélables à la ninhydrine, dont une correspondant à l'acide aspartique. Ce produit est inactif dans le test de flétrissement des feuilles de tomates.

Les solutions aqueuses amenées à sec sous vide ont été dissoutes dans le minimum d'eau et précipitées par le méthanol absolu à 0°. On obtient 15 mg de produit (ramollissement à 165°), F. 185-190° et 25 mg de produit F. 155-160°.

b) Structure :

Les deux fractions F. 185-190° et F. 155-160° se comportent de la même manière par spectrométrie de masse de leurs esters méthyliques et donnent des produits identiques par hydrolyse chlorhydrique. Les deux produits sont actifs dans les essais de flétrissement des feuilles de tomates; cependant, le produit F. 155-160° est moins actif.

Analyse $C_{11}H_{16}O_{10}N_2$:

	Calc. %	C	39,29	H	4,80	N	8,33
F=185-190°	Tr. %		39,63		4,76		8,79
155-160°			39,82		4,96		8,63

Calc. % pour la lactame $C_{11}H_{14}O_9N_2$

C	41,50	H	4,40	N	8,80
---	-------	---	------	---	------

Hydrolyse acide:

10 mg de substance ont été hydrolysés en tube scellé, 10 heures avec HCl 5 N à 110°.

Par chromatographie sur papier on constate la présence d'acide aspartique (mêmes systèmes et mêmes résultats que pour l'hydrolyse acide de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique).

Ce résultat est confirmé par l'électrophorèse.

Système n°1	Acide aspartique	18,5 cm
	hydrolysats	18,3 cmet (2,7 faible)
Système n°2	acide aspartique	1 cm
	hydrolysats	1 cmet (3 très faible)

Electrophorèse sur papier:

alanine	-1 cm
acide aspartique	+7 cm
hydrolysât	+6,9 cm
acide diaminopropionique	-8 cm

5- Réaction d'hydrogénolyse.

a) Préparation du diamino-2,3 propionate de benzyle:

A 10 mg d'acide diamino-2,3 propionique, on ajoute 1 ml d'alcool benzylique et 5 mg d'acide p-toluènesulfonique. On chauffe à reflux durant 2 heures avec agitation magnétique. On évapore ensuite l'alcool benzylique sous vide.

b) Préparation de l'amino-2 aspartyl-3 propionate de benzyle:

On opère dans les mêmes conditions en partant de l'acide amino-2 aspartyl-3 propionique.

c) Hydrogénolyse et étude chromatographique de ces deux corps:

Ces deux composés estérifiés ont été repris par le méthanol et soumis à l'hydrogénolyse dans les conditions normales. On observe ensuite par chromatographie:

diamino-2,3 propionate de benzyle hydrogénolysé

Système n°1	Alanine	19 cm
	produit d'hydrogénolyse	15,6 cm
	acide diamino-2,3 propionique	15,5 cm
Système n°2	produit d'hydrogénolyse	1 cm
	acide diamino-2,3 propionique	1 cm
	alanine	9,5 cm
électrophorèse (pH = 6,4)		
	produit d'hydrogénolyse	-5,9 cm
	acide diamino-2,3 propionique	-6 cm

amino-2 aspartyl-3 propionate de benzyle hydrogénolysé

Système n°1	produit d'hydrogénolyse	17,8 et 21 cm
	acide aspartique	17,8 cm
	α -alanine	21 cm

Système n°2	produit d'hydrogénolyse	2 cm et 10, 3 cm
	acide aspartique	2 cm
	α -alanine	10, 5 cm
Electrophorèse (pH = 6, 4)		
	produit d'hydrogénolyse	+7 cm et -1 cm
	acide aspartique	+7 cm
	α -alanine	-1 cm

CHAPITRE IV

1 - Acide céto-2 pipérazine carboxylique-5.

1 g de bromhydrate de l'acide diamino-2, 3 propionique est dissous dans 5 ml d'une solution saturée de baryte de titre connu. On ajoute alternativement 920 mg d'anhydride monochloroacétique (par petites portions) et de la baryte en quantité suffisante pour conserver un pH voisin de 10, 5. On abandonne 48 heures en vérifiant de temps à autre que le pH demeure bien alcalin et en ajoutant de la baryte si nécessaire. La quantité totale de baryte, est alors neutralisée par la quantité théorique d'acide sulfurique. Le sulfate de baryum est séparé par centrifugation et le précipité lavé une fois par l'eau. Les solutions réunies sont agitées 1 heure avec un excès de carbonate d'argent. Après filtration sur une couche de célite, on fait passer un courant de H_2S et on filtre de nouveau. On amène à sec sous vide, et on traite le produit par l'acétone et l'éthanol suivant la technique décrite par Greenstein.

On obtient de cette manière 520 mg d'un produit amorphe, non homogène par électrophorèse. L'acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 se distingue facilement des autres substances réagissant à la ninhydrine par sa coloration orange.

Cet extrait brut a été purifié par chromatographie sur colonne de poudre de cellulose (50 g pour 500 mg de produit) en utilisant un gradient d'élution. Les éluions ont été commencées avec le butanol; on ajoute des quantités croissantes d'un mélange éthanol-eau (1:1). Les éluions sont contrôlées au fur et à mesure par électrophorèse sur papier. L'acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 est élué en dernier, par le mélange éthanol-eau (1:1). Nous avons ainsi obtenu 180 mg de produit pur se présentant sous forme d'une poudre incolore (amorphe) F. 154-156°.

2 - Acide α -carboxyméthylamino- β -aminopropionique.

200 mg d'acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 sont portés au reflux dans 10 ml d'acide chlorhydrique 5 N pendant 15 heures. Le produit de cette réaction est amené à sec sous vide, sans dépasser 25° (on abandonne 15 jours en dessiccateur en présence de potasse sous un vide de 0, 5 mm). L'électrophorèse sur papier dans les conditions citées montre la disparition presque complète de l'acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 (donnant une coloration orange à la ninhydrine et l'apparition d'un nouveau produit de coloration violette (déplacement +1, 5 cm en 4 heures; acide aspartique +7cm).

Par chromatographie sur papier dans le système n°1 on a:

- acide aspartique $R_f = 0,42$
- acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 $R_f = 0,60$
- acide α -carboxyméthylamino- β -aminopropionique $R_f = 0,38$

et dans le système n°3

- acide aspartique $R_f = 0,27$
- acide céto-2 pipérazine carboxylique-5 $R_f = 0,21$
- acide α -carboxyméthylamino- β -aminopropionique $R_f = 0,10$

Le chlorhydrate obtenu se présente sous forme d'une poudre amorphe qui a été utilisée directement.

3- Aspergillomarasmine B.

860 mg de monomaléate de benzyle cristallisé sont dissous dans le minimum de méthanol absolu à 0°, puis on ajoute alternativement du méthanol et de la triéthylamine, jusqu'à concurrence d'un volume total de 3 ml de méthanol et de 15 ml de triéthylamine. On verse la solution homogène sur 114 mg de chlorhydrate d'acide α -carboxyméthylamino- β -aminopropionique. On porte à 90°, température du bain d'huile pendant 2 h. 30 avec agitation magnétique. Il y a formation d'huile. En amenant à sec sous vide sans dépasser 25°, on obtient 1960 mg de résidu qui a été utilisé aussitôt pour la suite de la réaction.

Le mélange réactionnel est dissous dans le minimum de méthanol; on ajoute 900 mg de palladium sur charbon (à 5 %) en suspension dans le méthanol (en prenant les mêmes précautions que précédemment). Lorsque l'absorption d'hydrogène a cessé, on évapore sous vide sans dépasser 25°; la poudre contenant le catalyseur est extraite 5 fois par une solution d'ammoniaque 0,1 N. Le catalyseur est séparé chaque fois par centrifugation; on amène les extraits à sec sous vide (sans chauffer). Nous avons obtenu 940 mg de produit.

L'électrophorèse sur papier indique que le produit de la réaction est un mélange de substances réagissant à la ninhydrine contenant un produit de même déplacement qu'un échantillon authentique d'aspergillomarasmine B.

Ce produit brut a été purifié une première fois par chromatographie sur colonne de 50 g de poudre de cellulose, en éluant par le mélange pyridine-eau (97,5:52,5) et en suivant les éluations par électrophorèse sur papier. On obtient 92 mg d'une substance montrant plusieurs taches révélabiles à la ninhydrine en électrophorèse sur papier. Ces 92 mg ont été

purifiés par électrophorèse préparative sur papier (mêmes conditions). On obtient 37 mg d'un produit homogène, donnant en électrophorèse sur papier une seule tache de même Rf que l'aspergillomarasmine B authentique.

La fraction ainsi purifiée a été cristallisée de la façon suivante. On dissout ces 37 mg dans un tube à centrifuger, par le minimum d'une solution 0,1 N d'ammoniaque. On amène à pH 2,5 par une solution d'acide sulfurique 0,1 N, et laisse ensuite 4 heures à -15°. On facilite la cristallisation par addition progressive d'acétone. On sépare par centrifugation, et lave successivement par un mélange glacé acétone-eau (1,1), puis par l'eau (quelques gouttes); le produit est séché par l'acétone et l'éther. Nous avons obtenu 6 mg de cristaux (grains) incolores F.215... (ramollissement) 225-235° (décomposition).

Analyse élémentaire $C_9H_{14}O_8N_2$

Calc. %	C 38,84	H 5,12	N 9,63
Tr. %	38,97	5,07	10,07

Analyse par chromatographie et électrophorèse

Système n°4	produit de synthèse	Rf : 0,25
	produit naturel	0,25
Système n°1	produit de synthèse	0,44
	produit naturel	0,44

Electrophorèse sur papier

+10 cm pour les deux substances (+7 cm pour l'acide aspartique).

Hydrolyse acide:

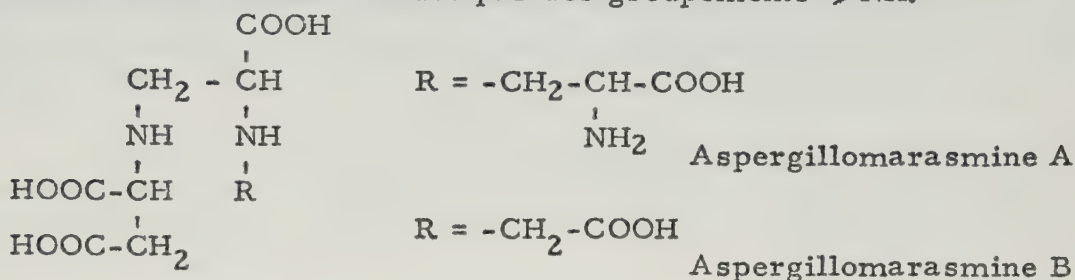
10 mg ont été hydrolysés en tube scellé pendant 14 heures en présence de 1 ml d'HCl 6 N, à 110°. Après avoir amené à sec sous vide, on étudie les acides aminés formés, par électrophorèse sur papier (système cité); trois taches sont observées, de déplacement : +9,5 , -0,07 , +7 correspondant respectivement aux Rf d'échantillons authentiques d'anhydro-aspergillomarasmine B, de glycocolle et d'acide aspartique.

Par chromatographie sur papier dans le système n°1 on observe les Rf de 0,42 pour l'acide aspartique, 0,50 pour le glycocolle et 0,33 pour l'anhydro-aspergillomarasmine B.

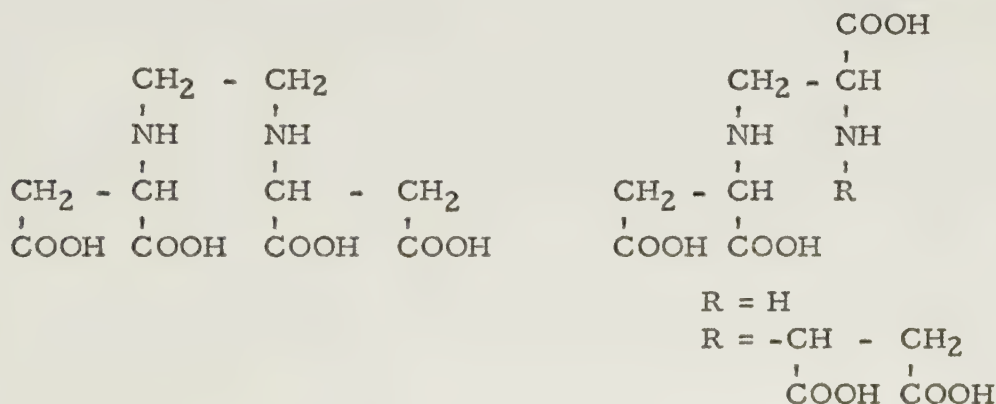
CONCLUSIONS

Selon la définition donnée par Gäuman, les marasmines sont des substances produites par des microorganismes et possédant une action flétrissante sur les feuilles de certaines plantes. Cette action est catalysée par les ions Fe^{3+} .

Aspergillus flavus oryzae produit deux marasmines, appelées aspergillomarasmine A et B. Ces substances, apparentées à la lycomarasmine, produites par les fusarium, appartiennent à une nouvelle famille de substances naturelles. Il s'agit d'acides iminés dans lesquels les chaînes carbonées sont réunies par des groupements $>\text{NH}$.



Nous avons décrit dans le présent travail la synthèse de l'aspergillomarasmine B racémique (ou acide lycomarasmique). Cette synthèse a présenté de nombreuses difficultés, essentiellement dues à la fragilité et à l'insolubilité de ces produits. Nous avons dû mettre au point les réactions utilisées, et cela faisant, avons préparé trois analogues biologiquement actifs: les acides éthylène-N, N'-diaspartique, aspartyl-3 diaminopropionique et diaspartyl-2, 3-diaminopropionique.



Nous avons obtenu les acides éthylène-N, N'-diaspartique, aspartyl-3 diaminopropionique et diaspartyl-2, 3-diaminopropionique avec des rendements respectifs de 18, 11 et 3 %. Pour l'aspergillomarasmine B le rendement très faible a été de 0,07 %.

Les résultats reportés dans ce travail conduisent à plusieurs conclusions.

La synthèse d'une aspergillomarasmine B et l'identification du produit obtenu avec la substance naturelle isolée d'Aspergillus flavus oryzae démontre l'exactitude de la formule proposée. La démonstration de cette identité est d'autant plus intéressante qu'une incertitude demeurerait quant à la position du carboxyle dans la partie centrale de la molécule de l'aspergillomarasmine B naturelle. La comparaison des deux produits, naturel et synthétique, par spectrométrie de masse, et aussi au cours des hydrolyses acides, montre la similitude de leur comportement. La position du carboxyle central dans le produit de synthèse étant déterminée, les schémas proposés pour l'explication des ions au cours de la spectrométrie de masse, ainsi que pour le mécanisme de l'hydrolyse acide deviennent très vraisemblables.

La synthèse d'analogues des aspergillomarasmines ouvre la voie à une série de composés qui peuvent être biologiquement intéressants. L'acide éthylène-N, N'-diaspartique en particulier a été obtenu assez facilement à l'état pur.

La comparaison des activités biologiques dans les essais de flétrissement sur les feuilles de tomates en présence d'ions ferriques met en évidence la non spécificité de l'activité des marasmines. De plus, nous n'avons pu observer de différences d'activité entre l'aspergillomarasmine B naturelle optiquement active et le produit synthétique racémique; il ne semble pas qu'il y ait donc un rapport entre la stéréochimie de ces marasmines et leur activité. Nous concluons à ce point de vue qu'il suffit que ces substances complexent le fer ferrique et que cet élément soit introduit en quantité suffisante dans le cytoplasme foliaire, quel que soit le mode de son transport.

Le mécanisme de l'action de certains défoliants utilisés en Agriculture (diquat et paraquat) a récemment été étudié (49, 50, 51, 52, 53). Ces substances provoquent une libération d'eau oxygénée qui entraîne des destructions cellulaires importantes. Le fer étant indispensable à l'action du diquat et du paraquat, il n'est pas impossible que l'activité biologique des marasmines et autres substances de synthèse à activité similaire soit liée à un mécanisme biologique semblable. La perturbation du métabo-

lisme/^{de l'eau} pourrait alors se comprendre par la destruction des stomates par l'eau oxygénée.

A notre connaissance, aucune synthèse de l'aspergillomarasmine A n'a été réalisée à ce jour; il s'agit-là d'un problème intéressant sur lequel il y aurait lieu de revenir.

D'autre part, on peut se demander par quel processus biologique les marasmines sont synthétisées et quel peut être leur rôle pour le micro-organisme en dehors de celui de phytotoxine, ce dernier étant de toute manière bien peu spécifique.

RESUME

Au cours des dernières années une nouvelle série d'acides aminés naturels a été mise en évidence, ce sont des acides iminés. Les marasmines appartiennent à cette série. Il s'agit de produits isolés de microorganismes, qui produisent le flétrissement rapide des végétaux par perturbation du métabolisme de l'eau. Cette action est catalysée par formation de complexes ferriques; les marasmines sont des agents complexant Fe^{3+} .

Le but essentiel de cette thèse a été la synthèse de l'aspergillomarasmine B racémique. L'aspergillomarasmine B, ou acide lycomarasminique est produit par Aspergillus flavus oryzae. La fragilité des marasmines leur insolubilité dans les solvants organiques usuels, et même dans l'eau à pH neutre, ont rendu une telle synthèse particulièrement délicate. Nous avons été amenés à étudier et mettre au point les réactions nécessaires, et selon un programme établi, nous avons d'abord préparé les acides éthylène-N, N'-diaspartique, aspartyl-3 diaminopropionique et diaspartyl-2,3 diaminopropionique.

Ces substances possédant deux azotes sur deux carbones voisins complexent Fe^{3+} , et en fait, sont actives dans les essais biologiques de flétrissement des feuilles de tomate.

Après cette étape préliminaire, la synthèse de l'aspergillomarasmine B a été réalisée à partir de l'acide α -carboxyméthylamino- β -aminopropionique déjà décrit dans la littérature. Nous avons isolé cette substance à l'état pur; elle est biologiquement active.

La structure chimique des substances synthétisées a été prouvée par l'étude des produits de dégradation, en particulier les hydrolyses acides, et par la spectrométrie de masse de leurs esters.

Nous avons prouvé l'identité de l'aspergillomarasmine B naturelle avec le produit de synthèse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- K. MORIZAWA, Acta Schol. Med. Univ. Kyoto, 10, 281 (1927).
- 2- E. MOORE et D. W. WILSON, J. Biol. Chem., 119, 573 (1937).
- 3- N. IZUMIYA, R. WADE, M. WINITZ, M. C. OTEY, S. M. BIRNBAUM, R. J. KOEGEL et J. P. GREENSTEIN, J. Am. Chem. Soc., 79, 652 (1957).
- 4- A. MENAGER et G. MOREL, Compt. Rend., 259, 4795 (1964).
- 5- C. LIORET, Bull. Soc. France Physiol. Végétale, 2, 76 (1956); Compt. Rend., 244, 2171 (1957).
- 6- K. BIEMAN, C. LIORET, J. ASSELINEAU, E. LEDERER, et J. POLONSKY, Biochim. Biophys. Acta, 40, 369 (1960); Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 979 (1960).
- 7- S. DARLING et P. O. LARSEN, Acta Chem. Scand., 15, 743 (1961).
- 8- A. KJAER et P. O. LARSEN, Acta Chem. Scand., 15, 750 (1961).
- 9- J. S. TURPIN et H. P. BROQUIST, Fed. Proc., 22, 243 (1963).
- 10- H. K. MITCHELL et M. B. HOULAHAN, J. Biol. Chem., 174, 883 (1948).
- 11- H. P. BROQUIST et A. V. STIFFEY, Fed. Proc., 18, 198 (1959).
- 12- H. P. BROQUIST, R. L. LARSON et W. O. SANDINE, Fed. Proc., 20, 9 (1961 b).
- 13- H. P. BROQUIST, Abs. of the VIth Intern. Congr. of Biochem., New York, 363 (1964).
- 14- H. P. BROQUIST, A. V. STIFFEY et A. M. ALBRECHT, Applied Microbiol., 9, 1 (1961 a).
- 15- N. CLAUSON-KAAS, P. A. PLATTNER et E. GAUMANN, Ber. Schweiz. Botan. Ges., 54, 523 (1944); P. A. PLATTNER et N. CLAUSON-KAAS, Helv. Chim. Acta, 28, 188 (1945); Experientia, 1, 195 (1945).
- 16- M. POUTEAU-THOUVENOT et M. BARBIER, Compt. Rend., 260, 5924 (1965).
- 17- M. POUTEAU-THOUVENOT et M. BARBIER, Compt. Rend., 262, 710 (1966).
- 18- E. HARDEGGER, P. LIECHTI, L. M. JACKMAN, A. BOLLER, et P. A. PLATTNER, Helv. Chim. Acta, 46, 60 (1963).

- 19- E. GAUMANN, *Advances in Enzymol.*, 11, 401 (1951).
- 20- E. LEDERER, *Pure and applied chemistry (IUPAC)*, 7, 247 (1963).
- 21- M. ROBERT, M. BARBIER, E. LEDERER, L. ROUX, K. BIEMANN, W. VETTER, *Bull. Soc. Chim. France*, 187 (1962).
- 22- A. L. HAENNI, M. BARBIER et E. LEDERER, *Compt. Rend.*, 255, 476 (1962).
- 23- A. L. HAENNI, M. ROBERT, W. VETTER, L. ROUX, M. BARBIER et E. LEDERER, *Helv. Chim. Acta*, 48, 729 (1965).
- 24- M. ROBERT, Thèse d'Université, Paris, 1962.
- 25- P. LIECHTI, Thèse de l'Ecole Polytechnique de Zürich, 1958.
- 26- E. HARDEGGER, J. SERES, R. ANDREATA, F. SZABO, W. ZANKOWSKA-JASINSKA, A. ROMEO, Ch. ROSTETTER et H. KINDLER, *Helv. Chim. Acta*, 46, 1065 (1963).
- 27- E. HARDEGGER, R. ANDREATA, F. SZABO, W. ZANKOWSKA-JASINKA, Ch. ROSTETTER et H. KINDLER, *Helv. Chim. Acta*, 50, 1539 (1967).
- 28- E. HARDEGGER, F. SZABO, P. LIECHTI, Ch. ROSTETTER et W. ZANKOWSKA-JASINSKA, *Helv. Chim. Acta*, 51, 78 (1968).
- 29- K. IZAKI, S. MIZUSHINA, H. TAKAHASHI et K. SAKAGUCHI, *Symposia on Enzyme Chemistry (Japon)*, 11, 143 (1956); S. MIZUSHINA et K. SAKAGUCHI, *Bull. Agri. Chem. Soc. Japan*, 20, 131 (1956).
- 30- D. BOGDANOVSKY et M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. France*, 832 (1965).
- 31- M. BARBIER, D. BOGDANOVSKY, W. VETTER et E. LEDERER, *Liebigs Ann. Chem.*, 668, 132 (1963).
- 32- D. BOGDANOVSKY et M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. France*, 2778 (1964).
- 33- K. BIEMANN et W. VETTER, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2, 93 (1960).
- 34- K. BIEMANN, *Chimia*, 14, 393 (1960).
- 35- K. BIEMANN, *Mass Spectrometry*, Mc Graw-Hill Book Company Inc., New York, 1962.
- 36- R. RYHAGE, *Arkiv. Kemi*, 13, 475 (1959).
- 37- R. RYHAGE, *Arkiv. Kemi*, 16, 19 (1960).
- 38- C. O. ANDERSON, R. RYHAGE, S. STALLBERG-STENHAGEN et E. STENHAGEN, *Arkiv. Kemi*, 19, 405 (1962).

- 39- R. LALIBERTE et L. BERLINGUET, Can. J. Chem., 40, 163 (1962).
- 40- A. ZILKHA et M. D. BACHI, J. Org. Chem., 24, 1096 (1959).
- 41- K. BIEMANN, J. SEIBL et F. GAPP, J. Am. Chem. Soc., 83, 3795 (1961).
- 42- K. HEYNS et H. F. BRUTZMACHER, Z. Naturforsch., 16b, 293 (1961).
- 43- K. BIEMANN, Communication personnelle. Cambridge (Mass.) USA, (1963).
- 44- H. K. SCHNOES, A. L. BURLINGAME et K. BIEMANN, Tetrahedron Letters, (London), 993 (1962).
- 45- S. VEIBEL et C. PEDERSEN, Acta Chem. Scand., 9, 1674 (1955).
- 46- K. PODUSKA, J. RUDINGER et F. SORM, Coll. Czech. Chem. Comm., 20, 1174 (1955).
- 47- P. S. BAILEY et R. E. LUTZ, J. Am. Chem. Soc., 70, 2412 (1948).
- 48- R. J. KOEGEL, S. M. BIRNBAUM, C. G. BAKER, H. A. SOBER et J. P. GREENSTEIN, J. Biol. Chem., 201, 547 (1953).
- 49- W. R. BOON, Endeavour, 26, 27 (1967).
- 50- A. T. JAGENDORF et M. AVRON, J. Biol. Chem., 231, 277 (1958).
- 51- R. HILL et D. A. WALKER, J. Physiol., 24, 240 (1959).
- 52- B. KOK, H. J. RURAINSKI et O. V. H. OWENS, Biochim. Biophys. Acta, 109, 347 (1965).
- 53- H. E. DAVENPORT, Rep. agric. hort. Res. Stu. Univ. Bristol., 32 (1960), Proc. R. Soc. B., 157, 332 (1963).

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES	15
PARTIE THEORIQUE	21
<u>Chapitre I</u> - Synthèse de l'acide N-butyl- DL-aspartique	22
<u>Chapitre II</u> - Synthèse de l'acide DL-éthylène- N, N'-diaspartique	26
<u>Chapitre III</u> - Synthèse de l'acide amino-2 aspar- tyl-3 propionique et de l'acide diaspartyl-2, 3 propionique.....	34
<u>Chapitre IV</u> - Synthèse de l'aspergillomarasmine B racémique (acide lycomarasmique)	42
<u>Chapitre V</u> - Activités biologiques des produits synthétiques	49
PARTIE EXPERIMENTALE	55
Systèmes de chromatographie et électrophorèse	56
<u>Chapitre I</u> - Synthèse de l'acide N-butyl- DL-aspartique	57
<u>Chapitre II</u> - Synthèse de l'acide DL-éthylène- N, N'-diaspartique	59
<u>Chapitre III</u> - Synthèse de l'acide amino-2 aspar- tyl-3 propionique et de l'acide diaspartyl-2, 3 propionique	61
<u>Chapitre IV</u> - Synthèse de l'aspergillomarasmine B racémique (acide lycomarasmique)	68
CONCLUSIONS	71
RESUME	74
BIBLIOGRAPHIE	75

